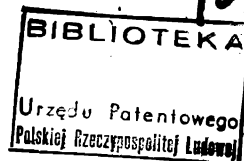


C 12 d 9/16



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 43450

Kl. 6 b, 16/03

Instytut Antybiotyków

Warszawa, Polska

Sposób otrzymywania nowego antybiotyku

Patent trwa od dnia 7 września 1959 r.

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania nowego antybiotyku Kandystyny na drodze biosyntezy za pomocą nowego szczepu *Streptomyces species* INA-7/58. Kandystyna podobna jest do znanego antybiotyku Fungicydyny, co stwierdzono na podstawie widma w nadfiolecie, skręcalności optycznej i wartości RF w chromatografii bibułowej.

Szczep *Streptomyces sp.* INA-7/58 otrzymany na drodze selekcji naturalnej nieznanego szczepu *Actinomyces sp.* A-94 różni się od dotychczas opisanych producentów Fungicydyny.

Na podłożu zawierającym: K_2HPO_4 (Merck) – 1,0 g, NaCl 1,0 g, $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0 g, $CaCO_3$ – 2,0 g, skrobię rozpuszczalną Difco – 10,0 g, agar Difco – 20,0 g, 500 ml wody wodociągowej, szczep *Streptomyces sp.* INA 7/58 wytwarza sporofory według nomenklatury Pridhama i Gottlieba określone jako „spirala”, a spory kształtu owalnego.

Na podłożu zawierającym: glicerol (Merck) – 10,0 g, asparaginę (Merck) – 1,0 g, K_2HPO_4 (Merck) – 1,0 g, agar Difco – 20,0 g wodę wodociągową – 1000 ml., grzybnia podstawowa szczepu *Streptomyces sp.* INA 7/58 ma zabarwienie białozółte, a powietrzna białoszara. Na podłożu zawierającym Bacto-tryptone Difco – 1,0 g, Bacto-Yeast Extract Difco – 1,0 g, NaCl – 8,5 g, agar – 17 g, wodę wodociągową 1000 ml, szczep *Streptomyces sp.* INA 7/58 nie wytwarza pigmentu typu melaniny. Niżej podano właściwości biologiczne szczepu *Streptomyces sp.* INA 7/58 w porównaniu z odpowiednimi właściwościami szczepu *Streptomyces noursei* ATCC 11455 producenta Fungicydyny.

Charakterystyka szczepu na podłożu Czapek-Doxa: $NaNO_3$ – 2,0 g, K_2HPO_4 – 1,0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5 g, KCl – 0,5 g, $FeSO_4$ – 0,01 g, sacharoza – 30,0 g, agar – 20,0 g, woda destylowana – 1000 ml.

Szczep	Strept. noursei ATCC 11455	Strept. sp. INA 7/58
Wzrost w temp. 37°C	brak	dobry
Zarodnikowanie	—	dobrze
Grzybnia powietrzna	—	biała, w 168 godz. szara
Pigment rozpuszczalny	—	—

Charakterystyka szczepu na podłożu z asparaginą: glukoza — 10,0 g, asparagina — 0,5 g, K_2HPO_4 — 0,5 g, agar — 20,0 g.

Szczep	Strept. noursei ATCC 11455	Strept. sp. INA 7/58
Wzrost w temp. 28°C	dobry	dobry
Zarodnikowanie	dobrze	dobrze
Grzybnia powietrzna	biało-szara	biało-szara
Pigment rozpuszczalny	ciemno-szary	brak

Charakterystyka szczepu na podłożu zawierającym: azotan potasowy — 1,0 g, wyciąg mięsny, szczep ATCC 11455, wykazuje ślady redukcji azotanów do azotynów, podczas gdy szczep Streptomyces sp. INA 7/58 nie redukuje azotanów do azotynów.

Charakterystyka szczepu na podłożu tryptono-glukozowym stałym: trypton — 1,0 g, glukoza — 1,0 g, agar — 2,0 g, woda destylowana — 100 ml.

Szczep	Strept. noursei ATCC 11455	Strept. sp. INA 7/58		
Temperatura	37°C	28°C	37°C	28°C
Wzrost	dobry	obfity	dobry	dobry
Zarodniko- wanie	dobrze	dobrze	dobrze	dobrze
Grzybnia powietrzna	kremowa	szara	biała	biała
	małe ilości, jasno- różowy	żółto- brązo- wo-zielony	brązo- wy	małe ilości żółto- brązo- wy
Pigment				

Charakterystyka szczepu na podłożu tryptono-glukozowym płynnym: trypton-1,0 g, glukoza — 1,0 g, woda destylowana — 100 ml.

Szczep	Strept. noursei ATCC 11455		Strept. sp. INA 7/58	
Temper.	37°C	28°C	37°C	27°C
Wzrost	dobry	dobry	dobry	dobry
Zarodniko- wanie	dobrze	obfite	obfite	obfite
Grzybnia powietrzna	biało- szara	biało- szara	biała	biało- szara
Pigment	granatowo-czer- wony			brak
	Wytwa- rza H ₂ S		nie wy- twarza H ₂ S	

Wyzolowany szczep Streptomyces sp. INA 7/58 służył do otrzymania mutantów produkcyjnych na drodze selekcji naturalnej oraz przy pomocy naświetlania promieniami nadfioletowymi.

Agar ziemniaczany z glukozą jest podłożem sporulacyjnym i podłożem do przechowywania szczepu Streptomyces sp. INA 7/58. Kultury na skosach inkubuje się w temperaturze 28°C w ciągu 7 — 10 dni. Gdy grzybnia powietrzna przybierze barwę szarą, szczep przechowuje się w chłodni w temperaturze 4°C. Poza tym szczep można przechowywać na kaszy perłowej, w ziemi i w postaci zliofilizowanej.

Sposób według wynalazku polega na prowadzeniu procesu biosyntezy na pożywce fermentacyjnej w obecności szczepu Streptomyces sp. INA 7/58, poniżej temperatury 30°C, najkorzystniej w temperaturze 27 — 29°C, aż do czasu wytworzenia przez ten szczep w grzybni Kandystyny, co trwa 60 — 84 godzin. Z przefermentowanej brzezki oddziela się grzybnie, np. przez odwirowanie lub przez filtrowanie, a uzyskaną grzybnie ekstrahuje się rozpuszczalnikiem np. metanolem. Wyciąg metanolowy, zawierający Kandystynę zagęszcza się w próżni, a otrzymany szlam poddaje się ponownej ekstrakcji metanolem w roztworze $CaCl_2$ i wytrąceniu wodą. Osad po przemyciu eterem lub innym nie rozpuszczającym Kandystyny organicznym rozpuszczalnikiem, suszy się w temperaturze nie przekraczającej 60°C. W celu uzyskania czystego krystalicznego produktu powtarza się proces ekstrakcji metanolem.

roztworem CaCl_2 lub innymi rozpuszczalnikami, w których Kandystyna jest dobrze rozpuszczalna.

P r z y k ł a d I. Dwustadiowa fermentacja w kolbach na trzęsawce.

Stadium I. W kolbie o pojemności 750 ml umieszcza się 100 ml pożywki posiewowej o składzie: wyciąg namoku kukurydzy — 0,5%, suchej substancji skrobi ziemniaczanej — 2,0% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,4%, CaCO_3 — 0,5%. Pożywkę doprowadza się do wartości $\text{pH} = 6,0$, wyjaławia w sposób powszechnie stosowany, po czym zaszczepia się zawiesiną zarodników w 0,85%-owym wodnym roztworze NaCl , uzyskanym przez splukanie z jednego skosu. Całość poddaje się inkubacji na trzęsawce w temperaturze 28°C przez 48 godzin.

Stadium II. 100 ml wyjałowionej pożywki produkcyjnej o składzie: wyciąg namoku kukurydzy — 0,5% (suchej substancji), glukozy — 4,0%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,4%, CaCO_3 — 0,8% doprowadzonej do wartości pH około 6,0, szczepi się w kolbie 750 ml 10% objętościowymi roślinnym inokulum, uzyskanego z stadium I i poddaje fermentacji na trzęsawce przez 96 godzin.

P r z y k ł a d II. Trzystadiowa fermentacja w fermentorach. I stadium posiewowe przeprowadza się w kolbach w sposób podany jak w przykładzie I.

Stadium II prowadzi się w fermentorze o pojemności np. 100 l. Podłoże produkcyjne o składzie jak wyżej, zawierające ponadto olej sojowy w ilości 0,3%, wyjaławia się w temperaturze 115°C przy 0,8 atm. w ciągu jednej godziny. Sterylną brzczkę w ilości 70 l szczepi się 48-godzinnym materiałem posiewowym z kolb w ilości 1% objętościowego i poddaje 16 — 48-godzinnej fermentacji w temperaturze 28°C , przy napowietrzaniu 20 — 70 l powietrza na minutę.

Stadium III prowadzi się w fermentorze o pojemności np. 1500 l na podłożu produkcyjnym wykonanym w sposób podany dla stadium II i przy utrzymaniu tychże parametrów lecz napowietrzaniu 200 — 600 l powietrza/minutę przez okres średnio 70 godzin. Koniec fermentacji następuje przy pH około 7,0 czyli z początkiem autolizy grzybni.

Oznaczenie Kandystyny w wyciągu z grzybni i w brzczce przeprowadza się za pomocą metody płytkowo-cylinderkowej, używając jako szczepu wzorcowego, szczep *Candida albicans* 102 lub *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Z uzyskanej w fermentacji brzcзки oddziela

się grzybnię np. przez odwirowanie na wirówce koszowej, lub przez filtrowanie na ramowej prasie filtracyjnej, po czym grzybnię umieszcza się w reaktorze o pojemności około 500 l, zadaje 200 — 300 objętościami wodnego 20 — 40%-go roztworu metanolu i ekstrahuje mieszając do całkowitego wyciągnięcia Kandystyny. Wyciąg metanolowy antybiotyku odparowuje się w niskiej próżni, w temperaturze nie przekraczającej 30°C , do uzyskania suchego szlamu barwy kremowej, który z kolei poddaje się ekstrakcji metanolowym roztworem CaCl_2 w stosunku 2 — 3 części roztworu na 1 część szlamu i następnie odwirowaniu lub odsączeniu na nuczcy.

Z otrzymanego przesączu, wytrąca się Kandystynę przez zadanie pięciokrotną ilością wody destylowanej. Wytrąconą surową Kandystynę odsadza się na nuczcy, przemycza eterem i suszy powietrzem.

W celu uzyskania czystego krystalicznego produktu ostatnią operację ekstrakcji roztworem metanolowym CaCl_2 powtarza się i kilkakrotnie rekrystalizuje z eteru. Wydajność Kandystyny wynosi 55 — 65% substancji wyjściowej.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania nowego antybiotyku Kandystyny, znamienny tym, że proces biosyntezy prowadzi się metodą fermentacji głębinowej w obecności szczepu *Streptomyces species* INA 7/58, w temperaturze poniżej 30°C na pożywce zawierającej przyswajalny węgiel, azot i sole mineralne, do czasu wytworzenia przez ten szczep w grzybni antybiotyku, który izoluje się metodą ekstrakcji i wytrącenia.
2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że powstały w grzybni antybiotyk ekstrahuje się kilkakrotnie wodnym 20 — 40%-ym roztworem metanolu, po czym wyciąg odsadza się i odparowuje w próżni w temperaturze nie przekraczającej 30°C , a uzyskany szlam ekstrahuje się metanolowym roztworem CaCl_2 i z ekstraktu wytrąca antybiotyk za pomocą wody, z kolei osad przemycza się eterem lub innym nie rozpuszczającym antybiotyku organicznym rozpuszczalnikiem, a w końcu suszy go w temperaturze nie przekraczającej 50°C i ewentualnie poddaje rekrystalizacji.

BIE.

Urząd Patentowy
Instytut Techniczny
Ludowa