



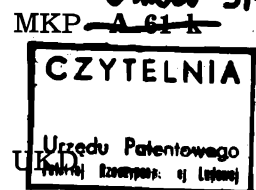
Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 14.I.1965 (P 106 978)

Pierwszeństwo:

Opublikowano: 10.XII.1968

Kl. 30 h, 6



Właściciel patentu: Fermentfarma S. p. A. (Buccinasco, Włochy)

Sposób wytwarzania tetracykliny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania tetracykliny na drodze biologicznej przy użyciu naturalnego szczepu z rodzaju *Streptomyces* i jego odmian, zwłaszcza szczepu przydatnego do celów przemysłowych.

Szczep ten posiada charakterystyczną właściwość tworzenia tetracykliny w obecności jonów chlorkowych nie wytwarzając jednocześnie chlortetracykliny. Ponieważ właściwości taksonomiczne tego gatunku *Streptomyces* są bardzo zbliżone do cech taksonomicznych *S. lusitanus* opisanego w patencie NRF nr 1 185 771, nazwano go obecnie *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T. Ze szczepu macierzystego *S. lusitanus* var. *tetracyclini*, przez staranną selekcję przy naświetlaniu światłem ultrafioletowym, otrzymano szczep szczególnie przydatny dla celów przemysłowych, który pod nazwą *Streptomyces lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T i pod numerem NCJB 9500 zdeponowano w National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen, Szkocja.

Znane są różne mikroorganizmy służące do wytwarzania tetracykliny, jak *S. Aureofaciens*, *S. sayamaensis*, *S. viridifaciens*, *S. psammoticus*, *S. persimilis* itd. Jednak szczep nowy *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T odróżnia się od wymienionych organizmów tym, że wytwarza tetracyklinę z wyjątkowo wysoką wydajnością, przewyższającą znacznie wydajność produkcyjną każdego ze znanych gatunków.

2

Fakt, że *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T wytwarza tetracyklinę w obecności jonów chlorkowych, ma duże znaczenie przemysłowe, ponieważ tetracyklina pod względem produkcyjnym i handlowym jest najważniejsza spośród wszystkich antybiotyków tetracyklinowych, a wytwarzanie podłoża hodowlanych zawierających jony chlorkowe jest znacznie tańsze niż wytwarzanie pożywek bezchlorkowych.

S. lusitanus var. *tetracyclini* 106-T wyodrębniono w Brive-la-Gaillarde, we Francji, w miejscowości zwanej „Miguol”. W oparciu o kryteria systemów klasyfikacyjnych Ettlingera i współpracowników oraz Pridhama i współpracowników, stwierdzono, że gatunek ten jest odrębny od wyżej wymienionych gatunków.

Zależnie od warunków fermentacji *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T produkuje 9—12 g tetracykliny w litrze brzeczki fermentacyjnej. (Zgodnie z międzynarodowym zwyczajem określenie „g/l” w niniejszym opisie odnosi się do chlorowodoru tetracykliny).

S. lusitanus var. *tetracyclini* 106-T ma proste, do falistych, sympodialnie rozgałęzione strzępki, które nie tworzą spirali ani okółków, lecz tworzą tylko otwarte haczyki. Pod mikroskopem elektronowym powierzchnia zarodników jest gładka. Kształt zarodników jest jajowaty, a ich rozmiary wynoszą 0,6—0,8 μ na 1,3—1,7 μ . Barwa zarodników w masie jest jasno-szara do oliwkowo-brązowej.

Na określonych „bogatych” podłożach nowa odmiana *Streptomyces* wytwarza na ogół bardzo dobrze zarodniki, podobnie jak *S. lusitanus* (CBS 101-A).

Według klasyfikacji Ettlingera *S. lusitanus* var. tetracyclini 106-T należy do grupy: strzępki proste do falistych, sympodialnie rozgałęzione, „gri-seus” do „cinnamoneus”, zarodniki gładkie, z pigmentem melaninowym.

Według systemu klasyfikacyjnego Pridhama i współpracowników *S. lusitanus* var. tetracyclini 106-T należy do grupy: „Retinaculum Apertum”, szereg „Szare” do „oliwkowo-brązowe”.

W celu porównania i różnicowania *S. lusitanus* var. tetracyclini 106-T opisano poniżej charakterystykę hodowlaną na 14 podłożach. *Streptomyces lusitanus* (CBS 101-A); *Streptomyces lusitanus* var. tetracyclini 106-T, NCJB 9500; *Streptomyces aureofaciens*, NRRL 2209 i *Streptomyces viridifaciens*, ATCC 11989, po 16-dniowej inkubacji w temperaturze 26°C.

1) Podłoże z namoku z kukurydzy (0,6%) o składzie:

agar-agar	10 g
wyciąg namokowy kukurydzy 50%	3 g
glikoza	15 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2,5 g
K ₂ HPO ₄	7,5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
MnCl ₂	0,002 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,002 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,025 g
woda	500 ml

pH=7 po wyjałowieniu.

Grzybnia powietrzna *S. lusitanus* jest lekko szara, *S. lusitanus* var. tetracyclini 106-T — ciemno brązowa, *S. aureofaciens* — ciemno szara, a *S. viridifaciens* — szara do prawie czarnej. *S. lusitanus* var. tetracyclini 106-T tworzy ciemno brązowy pigment rozpuszczalny w podłożu, natomiast pigment *S. viridifaciens* jest jaśniejszy. Wszystkie gatunki wzrastają dobrze.

2) Podłoże z namoku z kukurydzy (0,4%) o takim samym składzie jak podłoże 1) z tą jedynie różnicą, że zamiast 3 g użyto 2 g wyciągu namokowego kukurydzy. Wzrost wszystkich czterech gatunków jest podobny jak na podłożu 1), chociaż nieco powolniejszy.

3) Podłoże żelatynowe o składzie:

wyciąg z mięsa	1,5 g
pepton	2,5 g
żelatyna	80 g
woda destylowana	500 ml

pH=6,2, przed wyjałowieniem.

Wszystkie cztery kultury wzrastają w podobny sposób. Podłoże nie przechodzi w postać ciekłą. *S. aureofaciens* i *S. viridifaciens* nie wytwarzają pigmentu rozpuszczalnego, natomiast *S. lusitanus* wytwarza pigment żółty, a *S. lusitanus* var. tetracyclini 106-T — żółtawo-brązowy.

4) Podłoże dekstrynowe Czapek-Doxa o składzie:

dekstryna	5 g
NaNO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g

MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25 g
KCl	0,25 g
FeSO ₄	jeden mały kryształ
agar-agar	7,5 g
woda destylowana	500 ml

pH=6,8, po wyjałowieniu.

S. lusitanus i *S. lusitanus* var. tetracyclini 106-T nie rozwijają się na tym podłożu, natomiast *S. aureofaciens* i *S. viridifaciens* tworzą grzybnię podstawową o żółtym zabarwieniu, typową dla tych gatunków wytwarzających tetracyklinę.

5) Stała pożywka ziemniaczana

Stałą pożywkę ziemniaczaną (średnica 1,5 cm, wysokość 3–6 cm) przemyto 10%-owym roztworem węgla sodowego i wyjałowiono w probówce z 1,5 ml wody destylowanej.

S. aureofaciens i *S. viridifaciens* wzrastają dobrze z typowym złoto-żółtym zabarwieniem, charakterystycznym dla tych gatunków, podczas gdy barwa *S. lusitanus* jest brązowa, a *S. lusitanus* var. tetracyclini 106-T — ciemno-brązowa.

6) Agar Benneta o składzie:

wyciąg z drożdży	0,5 g
wyciąg z mięsa	0,5 g
zhydrolizowana kazeina	1 g
glikoza	5 g
agar-agar	10 g
woda destylowana	500 ml
wartość pH nastawiono na 7; po wyjałowieniu pH wynosiło 6,2.	

Wzrost czterech kultur jest podobny jak na podłożach 1) i 2), lecz *S. aureofaciens* i *S. viridifaciens* nie tworzą grzybni powietrznej, a zarodniki *S. lusitanus* var. tetracyclini 106-T mają „w masie” kolor brązowy, zaś w przypadku *S. lusitanus* — słaby szaro-biały. *S. aureofaciens* i *S. viridifaciens* nie tworzą pigmentu rozpuszczalnego, natomiast *S. lusitanus* i *S. lusitanus* var. tetracyclini 106-T tworzą pigment ciemno brązowy.

7) Podłoże glicerynowo-asparaginowe o składzie:

gliceryna	5 g
asparagina	0,25 g
wyciąg z mięsa	1 g
K ₂ HPO ₄	0,25 g
agar-agar	7,5 g
woda destylowana	500 ml
pH=6,9, po wyjałowieniu.	

S. lusitanus i *S. aureofaciens* nie tworzą grzybni powietrznej. *S. lusitanus* tworzy grzybnię barwy brązowej i pigment, podczas gdy *S. aureofaciens* nie tworzy pigmentu, a jego grzybnia jest żółtawo-biała. *S. lusitanus* var. tetracyclini 106-T wzrasta dobrze tworząc skąpą jasno brązową grzybnię powietrzną i pigment tej samej barwy co pigment *S. lusitanus*. Natomiast *S. viridifaciens* tworzy obfitą, jasno szarą grzybnię powietrzną nie wytwarzając przy tym pigmentu rozpuszczalnego.

8) Podłoże Czapek-Doxa o składzie:

NaNO ₃	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,25 g

KCl 0,25 g
 FeSO₄ jeden mały kryształek
 agar-agar 7,5 g
 woda destylowana 500 ml
 pH=7,1, po wyjałowieniu.

S. lusitanus i *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T nie wzrastają na tym podłożu podobnie jak i na wszystkich innych podłożach, które jako jedyne źródło azotu zawierają tylko związki nieorganiczne. *S. aureofaciens* i *S. viridifaciens* wzrastają dobrze, bez jakiegokolwiek grzybni powietrznej i wykazują typową, jasno żółtą barwę.

9) Agar Emersona o składzie:

wyciąg z drożdży 2 g
 skrobia rozpuszczalna 7,5 g
 K₂HPO₄ 0,5 g
 MgSO₄ · 7 H₂O 0,25 g
 agar-agar 10 g
 woda destylowana 500 ml
 pH=7, po wyjałowieniu.

Na podłożu tym *S. lusitanus* wzrasta dobrze, ma barwę brązowo-liliową, wytwarza brązowy pigment rozpuszczalny, lecz nie tworzy grzybni powietrznej. *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T wzrasta podobnie, lecz tworzy lekką grzybnę powietrzną barwy oliwkowo-brązowej. *S. aureofaciens* charakteryzuje się słabym wzrostem bez wytwarzania pigmentu, zaś *S. viridifaciens* wzrasta lepiej i tworzy skąpą grzybnę powietrzną oraz jasno-żółty pigment rozpuszczalny.

10) Pożywka skrobiowa Czapek-Doxa o składzie:

skrobia rozpuszczalna 5 g
 NaNO₃ 1 g
 K₂HPO₄ 0,5 g
 MgSO₄ · 7 H₂O 0,25 g
 KCl 0,25 g
 FeSO₄ jeden mały kryształek
 agar-agar 7,5 g
 woda destylowana 500 ml
 pH=7, po wyjałowieniu.

Wyniki odpowiadają wynikom uzyskanym w przypadku innych pożywek zawierających azotan. *S. lusitanus* i *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T nie wzrastają, natomiast *S. aureofaciens* i *S. viridifaciens* tworzą żółto-pomarańczową grzybnę podstawową bez pigmentu i bez grzybni powietrznej.

11) Mleko lakmusowe

pH=6,45, po wyjałowieniu.

Wszystkie cztery kultury wzrastają powoli w postaci pierścienia wzdłuż próbki nie przyswajając mleka, ani go nie koagulując. Występuje mała, ale wyraźna różnica wartości pH podłoża, pomiędzy *S. lusitanus* oraz *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T, a *S. aureofaciens* oraz *S. viridifaciens*.

12) Pożywka o składzie:

wyciąg z mięsa 1,5 g
 pepton 2,5 g
 agar-agar 7,5 g
 woda destylowana 500 ml
 pH=6,8, po wyjałowieniu.

Wszystkie kultury są jednakowe, lecz *S. lusitanus* i *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T wy-

tworząc rozpuszczalny pigment ciemniejszy niż w przypadku *S. aureofaciens* i *S. viridifaciens*.

13) Podłoże glikozowo-asparaginowe o składzie:

glikoza 1 g
 asparagina 0,25 g
 wyciąg z mięsa 1 g
 K₂HPO₄ 0,25 g
 agar-agar 7,5 g
 woda destylowana 500 ml
 pH=6,9, po wyjałowieniu.

S. lusitanus, *S. aureofaciens* i *S. viridifaciens* wzrastają w podobny sposób, tworząc grzybnę powietrzną, przy czym *S. lusitanus* i *S. viridifaciens* wytwarzają brudny, ciemno-żółty pigment rozpuszczalny. *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T nie tworzy grzybni powietrznej, zaś jego pigment jest taki sam jak w przypadku *S. lusitanus*.

14) Podłoże cukrowo-dekstrynowo-azotanowe o składzie:

dekstryna 5 g
 NaNO₃ 1 g
 MgSO₄ · 7 H₂O 0,25 g
 KCl 0,25 g
 dekstroza 15 g
 FeSO₄ jeden mały kryształek
 woda destylowana 500 ml
 pH=7, po wyjałowieniu.

S. lusitanus i *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T nie wzrastają na tym podłożu, podczas gdy *S. aureofaciens* tworzy jasno żółtą grzybnę podstawową, zaś grzybnia podstawowa *S. viridifaciens* ma barwę ciemno pomarańczową. Wykorzystanie źródeł węgla przez ten szczep w stadium początkowym nie można było określić przy zastosowaniu metody Okhi (Okhi N, Kitasoto Atch. Erop. Med. 25, 209, 1953), ponieważ w obecności wyłącznie nieorganicznego źródła azotu, *S. lusitanus* nie wzrasta. W tym celu zastosowano metodę Pridhama i Gottlieba, opisaną przez Zächnera i Ettlingera w Arch. f. Mikrobiol. 26, 307, 1957. Obserwacji dokonywano w 10 dniu. W poniższej tablicy zestawiono w celu porównania jedynie sześć źródeł węgla, uznanych przez Zächnera i Ettlingera jako charakterystyczne i mające znaczenie dla oznaczania gatunków.

Pod względem wykorzystania źródła węgla oraz zgodnie z systemem klasyfikacyjnym Zächnera i Ettlingera, *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T i *S. lusitanus* 101-A należą do grupy IIIe, zaś *S. aureofaciens* należą do grupy IIIa.

Wszystkie szczepy dodatkowo wykazują zużycie glikozy i dekstrozy ze źródeł węgla nietypowych dla klasyfikacji. *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T i *S. lusitanus* 101-A, w przeciwieństwie do *S. aureofaciens* i *S. viridifaciens*, nie wzrastają w obecności laktozy. Jedyną różnicą pomiędzy *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T i *S. lusitanus* 101-A jest to, że w obecności trehalozy pierwszy szczep wzrasta silnie podczas gdy szczep drugi — nie wzrasta. *S. lusitanus* i *S. lusitanus* var. *tetracyclini* wzrastają na celulozie, natomiast *S. aureofaciens* i *S. viridifaciens* nie mogą wykorzystywać tego źródła węgla.

Przyswajanie węgla

Źródło węgla	S. lusitanus		szczep NRRL 2209 (badanie własne)	S. aureofaciens badanie według		S. viridifaciens (3)
	var. tetracyclini 106-T	101-A		Zähner'a i Ettlinger'a (1)	Benedict'a (2) Szczepy: NRRL-B 1286, 1287, 1288, 2209	
ramnoza	+	—	—	—	— do (—)	+
rafinoza	—	—	—	—	(—)	..
d-ksyloza	—	—	+	+	(+) do +	+
d-fruktoza	(—)	—	+	+	+	+
l-arabinoza	(—)	(—)	+	+	+	+
d-mannitol	—	—	—	+/-	(—)	+

— brak przyswajania

+ przyswajanie dodatnie

.. brak danych

(—) przyswajanie nieprawdopodobne

(+) przyswajanie prawdopodobne

+/- przyswajanie dodatnie lub ujemne zależne od szczepu

(1) Zähner u. Ettlinger, Arch. f. Mikrobiol., 26, 307, 1957

(2) Benedict et al., Appl. Microbiol., 3, 1, 1955

(3) Opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 2 886 595.

Sposób według wynalazku jest sposobem odpowiednim do stosowania przemysłowego, w związku z czym *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T jest szczepem wyselekcjonowanym dla celów przemysłowych, a jego badanie taksonomiczne jedynie w zakresie zgodnym z obowiązującymi obecnie wymaganiami klasyfikacyjnymi jest niewystarczające. Z tych powodów zdeponowano w różnych zbiorach hodowli drobnoustrojów *S. lusitanus* i *S. lusitanus* var. *tetracyclini* w postaci szczepów macierzystych początkowo wyodrębnionych z gleby.

W związku z tym podjęto taksonomiczne różnicowanie innych znanych gatunków wytwarzających tetracyklinę, w ten sposób, że porównano ze sobą zarówno szczepy pierwotne jak szczepy przemysłowe będące przedmiotem sposobu według wynalazku.

U *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T nie można dokonać oceny wytwarzania pigmentu melaninopodobnego, ponieważ wyselekcjonowane różne typy szczepów przemysłowych nie wzrastają wcale, albo też wzrastają w stopniu bardzo niedostatecznym, na pożywce Ettlingera, wytwarzającej pigment melaninopodobny (wyciąg z drożdży 0,5 g, L-tyrozyna 0,5 g, NaCl 4,25 g, agar 8 g, woda wodociągowa 500 ml).

Początkowo wyodrębnione szczepy *S. lusitanus* i *S. lusitanus* var. *tetracyclini* (szczepy macierzyste szczepów używanych w celach przemysłowych) sprawdzano zwłaszcza na tym podłożu.

S. lusitanus na podłożu tyrozynowym wytwarzał w ciągu 2 dni czerwony pigment (najprawdopodobniej składający się z hallochromu albo 5,6-dwuhydroksyindolu), który powoli utleniał się na pigment ciemny, nie zmieniający swojej barwy przy zmianach wartości pH.

Krzywa absorpcji w ultrafiolecie wyekstrahowanego pigmentu jest identyczna z opisaną przez Schmidliego (Helv. Chim. Acta, 38, 1078, 1955) krzywą dla pigmentu melaninowego. *S. lusitanus* var. *tetracyclini* wytwarza po 3—4 dniach bezpośrednio czarny pigment (bez pośredniego pigmentu czerwonego), który pod każdym względem odpowiada „syntetycznej” melaninie, otrzymanej przez utlenianie DOPA[β-3,4-dwuhydroksy-fenyl)-α-alaniny].

Zarówno *S. lusitanus* jak i *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T wytwarzają na podłożu tyrozynowym pigment melaninopodobny, chociaż odbywa się to dwiema różnymi drogami, podczas gdy ani *S. aureofaciens* ani *S. viridifaciens* nie wytwarzają pigmentu melaninopodobnego na żadnej z tych dróg.

Szczep macierzysty szczepu *S. lusitanus* var. *tetracyclini* na określonych podłożach, jak na przykład na agarze tyrozynowym Ettlingera, ma zdolność wytwarzania przetrwalników.

S. lusitanus 101-A i *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T, jak również ich szczepy macierzyste wzrastają w temperaturze 50°C. Ani w przypadku *S. lusitanus*, ani w przypadku *S. lusitanus* var. *tetracyclini* nie obserwowano okółek, podczas gdy u dojrzałych kultur zarówno *S. aureofaciens* jak i *S. viridifaciens* okółki znajdowano często.

W poniższej tablicy zestawiono najważniejsze różnice taksonomiczne pomiędzy *S. lusitanus* i *S. aureofaciens*.

Cecha rozróżniająca	<i>S. lusitanus</i> var. <i>tetracyclini</i> 106-T	<i>S. lusitanus</i> CBS 101-A	<i>S. aureofaciens</i>
Morfologia strzępków	rozgałęzienie sympodialne; brak okółek	rozgałęzienie sympodialne; brak okółek	rozgałęzienie monopodialne; okółki występują
Barwa zarodników „w masie”	cinnamoneus do griseus	cinnamoneus do griseus	cinereus
Wytwarzanie pigmentu melaninowego na podłożu tyrozynowym	ujemne (szczep macierzysty: dodatnie)	ujemne (szczep macierzysty: dodatnie)	ujemne

C. d. tabl.

Cecha rozróżniająca	S. lusitanus var. tetracyclini 106-T	S. lusitanus CBS 101-A	S. aureofaciens
Wykorzystanie nieorganicznych źródeł azotu	ujemne	ujemne	dodatnie
Wykorzystanie źródeł węgla wg Záhnera i Ettlingera	należy do grupy IIIe	należy do grupy IIIe	należy do grupy IIIa

Porównanie to wykazuje, że (w dopuszczalnym zakresie wariacji gatunku) *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T różni się niewiele od wytwarzającego chlorotetracyklinę *S. lusitanus* (CBS 101-A), natomiast różnice występują wyraźnie i są znaczne między *S. lusitanus* var. *tetracyclini* i *S. aureofaciens* lub *S. viridifaciens*.

Jedyną różnicę między szczepami macierzystymi i *S. lusitanus* 101-A albo *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T stanowi to, że strzępki obu szczepów macierzystych należą do grupy „Spira”, podczas gdy w przypadku *S. lusitanus* 101-A — należą do grupy „Rectus flexibilis”, a w przypadku *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T — do grupy „Rectinaculum apertum”. Jednak u wszystkich czterech szczepów strzępki są rozgałęzione sympodialnie.

Pośrednim dowodem odrębności gatunkowej *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T od *S. aureofaciens* jest fakt, że powstała w trakcie fermentacji barwa całej brzeczki pofermentacyjnej nie zawierającej chlorotetracykliny, znacznie różni się od barwy opisanej w opisie patentowym St. Zjedn. Am. nr 3092 556 dla *S. aureofaciens*. Spektrofotometryczny współczynnik odbicia pofermentacyjnej brzeczki z hodowli *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T oznaczono przy długościach fali od 400—700 m μ , w kuwetkach szklanych 1 cm, przy użyciu węglanu magnezowego jako wzorca. Współczynniki odbicia (R) oraz odpowiadające im długości fal nanoszono liniowo na wykres, otrzymując w wyniku charakterystyczną krzywą refleksji. Następnie przez punkty na na krzywej, odpowiadające 400 m μ i 550 m μ , przeprowadzono linię prostą i zmierzono pionową odległość między tą prostą i krzywą refleksji dla 420 m μ i 430 m μ . Wartości te oznaczono symbolami ΔR_{420} lub ΔR_{430} . W przypadku *S. aureofaciens* zgodnie z opisem patentowym St. Zjedn. Am. nr 3092 556, ΔR_{420} jest zawsze większa od ΔR_{430} , natomiast w przypadku *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T ΔR_{420} jest zawsze mniejsza mimo, iż brzeczka z hodowli *S. lusitanus* var.

tetracyclini 106-T nie zawiera wykrywalnych ilości chlorotetracykliny (poniżej 50 mcg/l).

Istotny fakt, że *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T wytwarza o 2—5 g tetracykliny w litrze więcej niż wynosi — znaleziona w literaturze — najwyższa produkcyjność mikroorganizmów wytwarzających tetracyklinę, wskazuje pośrednio na odrębność tego gatunku. To zwiększenie produkcyjności stanowi istotny techniczny postęp w wytwarzaniu tetracykliny.

Stwierdzono, że aczkolwiek zarówno *S. lusitanus* jak i *S. lusitanus* var. *tetracyclini* hydrolizują skrobię — to użycie gotowego produktu hydrolizy skrobi umożliwia zwiększenie ilości źródła węgla na litr brzeczki, znajdującego się do dyspozycji, przy czym jednocześnie ma miejsce znaczny wzrost wydajności produkcyjnej (aktywności antybiotycznej) na litr sfermentowanej brzeczki.

Najkorzystniejsze wyniki uzyskuje się z produktem hydrolizy, który zawiera nie więcej niż 20% niehydrolizowanej skrobi kukurydzianej i nie więcej niż 20% dwu- i monosacharydu, przy czym resztę to jest 60% stanowią oligosacharydy. Taki półhydrolizat skrobi można dodawać w ilości do 65 g/l nie powodując nadmiernego wzrostu lepkości podłoża. Jeżeli zaś — dla porównania — dodaje się 65 g/l, albo nawet znacznie mniejszą ilość skrobi żytniej, powoduje to niemal zastąpienie się podłoża, co z kolei uniemożliwia prowadzenie fermentacji głębinowej.

Wydajności tetracykliny w takich warunkach wynoszą na ogół powyżej 12 g/l. Zwiększenie ilości źródeł węgla umożliwia z drugiej strony niknięcie stosowania oleju smalcowego jako źródła węgla, bez zauważalnego obniżenia wydajności. Pienienie się brzeczki można wówczas regulować przy użyciu małej ilości sliконu jako środka przeciwpiennego.

Pożywka wodna służąca do przemysłowej fermentacji z hodowli *S. lusitanus* var. *tetracyclini* 106-T zawiera przyswajalne źródła organicznego azotu, węgla oraz sole mineralne, łącznie z chlorkami, które przyspieszają wzrost mikroorganizmu.

Jako źródło azotu można stosować hydrolizat kazeiny, wyciąg ze siodu jęczmienia lub kukurydzy, wyciąg namokowy kukurydzy, mączkę arachidową, sojową itp. Nieorganiczne azotany są nieprzydatne.

Jako źródło węgla można stosować różne węglodowodny jak glikoza, dekstoza, maltoza, trehaloza, skrobia, hydrolizat skrobiowy, dekstryna, tłuszcze zwierzęce lub roślinne albo kwasy tłuszczowe.

Ilości poszczególnych składników w pożywkach podają przykłady.

Dodatek N,N' - dwubenzylodietanolodwuminy (DBED) w postaci octanu lub mleczanu w ilości 0,01—1,5 g/l powoduje wzrost wydajności w porównaniu z jednocześnie prowadzonymi próbami porównawczymi bez dodatku DBED. Związek ten dodaje się do brzeczki w różnych porcjach podczas procesu fermentacji. Fermentację prowadzi się w temperaturze 24—30°C, przy jednoczesnym

mieszaniu i silnym napowietrzaniu (0,1—40 objętości powietrza na 1 objętość brzezki na minutę, zależnie od fazy procesu).

Konieczny dla uzyskania najwyższej wydajności czasu fermentacji, wynosi od 96—150 godzin, zależnie od warunków prowadzonego procesu.

Sposób wytwarzania tetracykliny według wynalazku jest selektywny, to jest po zakończeniu fermentacji brzezka nie zawiera uchwytanych ilości chlorotetracykliny.

Po zakończeniu procesu fermentacji, czynny składnik podstawowy ekstrahuje się i oczyszcza w sposób opisany w opisie patentowym NRF nr 1185 771. Dokładny opis postępowania przy oczyszczaniu zawierają przytoczone przykłady.

Produkt końcowy, który otrzymuje się w postaci chlorowodoru tetracykliny, posiada następujące właściwości fizyczne i chemiczne: rozkłada się przy około 240°C; skręcalność właściwa (α)_D²⁴ — 258 (C=0,5 w 0,1 n HCl; bardzo dobra rozpuszczalność w wodzie, metanolu i etanolu. Skład elementarny trójwodoru zasady odpowiada wzorowi $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot 3H_2O$; temperatura topnienia 170—175°C z rozkładem.

Wszystkie właściwości fizyczne, chemiczne i biologiczne otrzymanego produktu, zarówno w postaci zasady jak i w postaci chlorowodoru, odpowiadają opisanym w literaturze cechom tetracykliny.

Szczególnie cenną zaletą sposobu według wynalazku w przemysłowym zastosowaniu *S. lusitanus* var. tetracyclini 106-T jest to, że uzyskuje się bardzo wysokie wydajności przy bardzo niskich kosztach podłoża hodowlanego.

Poniższe przykłady służą do objaśnienia sposobu według wynalazku, lecz nie stanowią jego ograniczenia.

Przykład I. Wszystkie podłoża hodowlane sporządza się na wodzie wodociągowej. 1 l wyjałowionego podłoża ma następujący skład:

wyciąg namokowy kukurydzy 50%-owy	10 g
cukier	10 g
CaCO ₃	1 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25 g
woda dopełniona do	
(pH=6,4, po wyjałowieniu)	1000 ml

Jeden litr podłoża hodowlanego szczepiono w kolbie 1 ml zawiesiny dojrzałych zarodników *S. lusitanus* var. tetracyclini 106-T w roztworze fizjologicznym chlorku sodowego i trzymano przez 36 godzin w temperaturze 26°C w trzęsawce obrotowej.

Następnie, otrzymaną 36-godzinne hodowlę zaszczepiono podłoże o składzie:

wyciąg namokowy kukurydzy 50%-owy	35 g
CaCO ₃	13 g
cukier	5 g
woda dopełniona do	
(pH=6,7, po wyjałowieniu)	1000 ml

znajdujące się w fermentatorze wstępnym o pojemności 150 l.

Fermentację prowadzono przez 24 godziny w

temperaturze 26°C przy mieszaniu i napowietrzaniu.

W końcu powyższą 24 godziną szczepionką wegetatywną zaszczepiono podłoże o składzie:

5	wyciąg namokowy kukurydzy 50%-owy	28 g
	CaCO ₃	14 g
	skrobia	38 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	5,7 g
	NH ₄ Cl	1,5 g
10	MnSO ₄ · 4 H ₂ O	0,05 g
	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,0002 g
	ZnSO ₄	0,05 g
	mączka arachidowa	25 g
	olej smalcowy	35 g

15 woda wodociągowa do (pH=6,7—6,8, po wyjałowieniu) 1000 ml

i w fermentatorze o pojemności 6000 l prowadzono fermentację przez 24 godziny w temperaturze 30°C doprowadzając powietrze z szybkością 1,5 l/l na minutę. Z kolei temperaturę obniżono do 26°C, a napowietrzanie zwiększono powoli w ten sposób, że pod koniec 140-ej godziny fermentacji szybkość jego wynosiła 4 l/l na minutę.

25 Po 140 godzinach fermentacji otrzymano 11,1 g tetracykliny w litrze brzezki; chlorotetracykliny nie można było wykryć (poniżej 50 mcg/l).

Przykład II. Postępuje się podobnie jak w przykładzie I, lecz do produkcyjnego podłoża hodowlanego dodaje się dwuocianu N,N'-dwubenzylloetylenodwuaminy w ilości 0,5 g/l, w czterech równych porcjach na początku fermentacji, po 36, 72, i 98 godzinach fermentacji. Po 140 godzinach otrzymuje się tetracyklinę w ilości 12,3 g/l.

35 Przykład III. Brzezke pofermentacyjną otrzymaną w przykładzie I zakwasza się 25%-owym kwasem siarkowym do wartości pH=1,5, sączy się przez filtr obrotowy, po czym grzybnie ekstrahuje się dwukrotnie wodą o pH do 1,5. Do połączonych przesączy dodaje się 18 kg „Verse-
40 ne” (wersenian, środek tworzący rozpuszczalny kompleks) i 16,5 kg dwuocianu DBED a następnie 12%-owym amoniakiem powoli nastawia wartość pH na 9,7. Po 3 godzinym mieszaniu odsączy się osad składający się zasadniczo z zanieczyszczonego kompleksu DBED — tetracyklina, który ma wzór DBED · Ca (tetracyklina)₂. Następnie wilgotny osad przeprowadza się mieszając, w postaci zawiesiny w wodzie, którą zakwasza się 10%-owym wodnym roztworem kwasu szczawiowego do wartości pH 1,5. Roztwór przesącza się i 10%-owym wodnym roztworem wodorotlenku sodowego doprowadza do wartości pH=5,8. Wytrąca się tetracyklina w postaci zasady. Osad odsączy się, przemyciwa i suszy pod próżnią w temperaturze 65°C. Rzeczywista wydajność, odniesiona do aktywności, wynosi 83,5%.

50 Przykład IV. Postępuje się w sposób opisany w przykładzie III, lecz zamiast DBED dodaje się 16 kg N,N'-dwubenzylloetylenodwuaminy (C₆H₅ · CH = N · CH₂ · CH₂ · N = CH · C₆H₅) przy wartości pH=6. Wydajność użyteczna odniesiona do aktywności, wynosi 86% (produkt w postaci za-
55 sady).

Przykład V. Postępuje się podobnie jak w przykładzie I, lecz podłoże hodowlane w fermentatorze produkcyjnym zastępuje się podłożem o składzie:

wyciąg namokowy kukurydzy 50%-owy	31	g
CaCO ₃	14	g

pólhydrolizat skrobi, który zawiera nie więcej niż 20% niezhydrolizowanej skrobi kukurydzianej i nie więcej niż 20% mono-i dimerów; jako resztę —

oligomery	63	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,7	g
NH ₄ Cl	1,5	g
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	0,05	g
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,002	g
ZnSO ₄	0,05	g
FeSO ₄	0,04	g
mączka arachidowa	25	g
olej smalcowy	28	g
olej arachidowy	4	g
(pH 6,7—6,8)		

Wydajność końcowa wynosi 12,2 g/l. Chlorotetracykliny nie można wykryć (poniżej 50 mcg/l). Z krzywej refleksyjności dla brzeczeki pofermentacyjnej otrzymano $\Delta R_{420}=18$ i $\Delta R_{430}=92,4$.

Przykład VI. Postępuje się jak w przykładzie V, lecz stosuje się podłoże nie zawierające ani oleju smalcowego, ani oleju arachidowego. Tworzenie się piany reguluje się za pomocą silikonowego środka przeciwpiennego. Po 136 godzinach fermentacji wydajność wynosi 10,1 g/l. W brzeczce nie wykryto chlorotetracykliny.

Przykład VII. 40 ml wyjałowionego podłoża hodowlanego, o składzie podanym w przykładzie I dla fermentacji produkcyjnej, w 300 ml kolbie Erlenmayera, zaszczepia się rozwijającymi się zarodnikami *S. lusitanus* var. tetracyclini 106-T i umieszcza na trzęsawce obrotowej, w temperaturze 28°C, na okres 7 dni. Wykreśla się krzywą refleksyjności dla brzeczeki pofermentacyjnej i wylicza wartości ΔR . Znalaziono: $\Delta R_{420} = 3,8$ i $\Delta R_{430} = 34,2$.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania tetracykliny na drodze biosyntezy, **znamienny tym**, że do biosyntezy stosuje się szczep *Streptomyces lusitanus* var. tetracyclini 106-T.