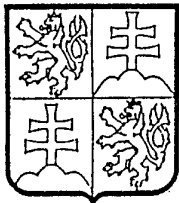


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu :

276 983

(21) Číslo přihlášky : 8192-86

(22) Přihlášeno : 08.10.85

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

C 07 K 7/56

C 12 P 21/04

(40) Zveřejněno : 18.03.92

(47) Uděleno : 30.09.92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18.11.92

(73) Majitel patentu : ELI LILLY AND COMPANY, Indiana, US

(72) Původce vynálezu : Huber Floyd Milton, Indiana, US; Pieper Richard Louis, Indiana, US; Tietz Anthony Joseph, Indiana, US; Eaton Tom Edward, Indiana, US; Ford Lynda Maxine, Indiana, US; Gofrey Otis Webster jr., Indiana, US; Huber Mary Louise Braun, Indiana, US; Zmijewski Milton Joseph, Indiana, US

(54) Název vynálezu : Způsob výroby antibiotika A-21978C ve formě komplexu nebo jeho faktorů

(57) Anotace :

Způsob výroby komplexu antibiotika A-21978C ve formě komplexu nebo jeho faktorů pěstováním mikroorganismu v živném prostředí, obsahujícím využitelné zdroje uhlíku, dusíku a anorganických solí v submersní kultuře za aerobních podmínek, přičemž se v živném prostředí pěstuje *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998 nebo jeho mutanta, variantu nebo rekombinanta, produkující uve-
dené antibiotikum při teplotě 20 až 40 °C a pH 6,5 až 7,0, načež se popřípadě komplex antibiotika A-21978C oddělí a popřípadě se z komplexu izolují jeho jednotlivé faktory.

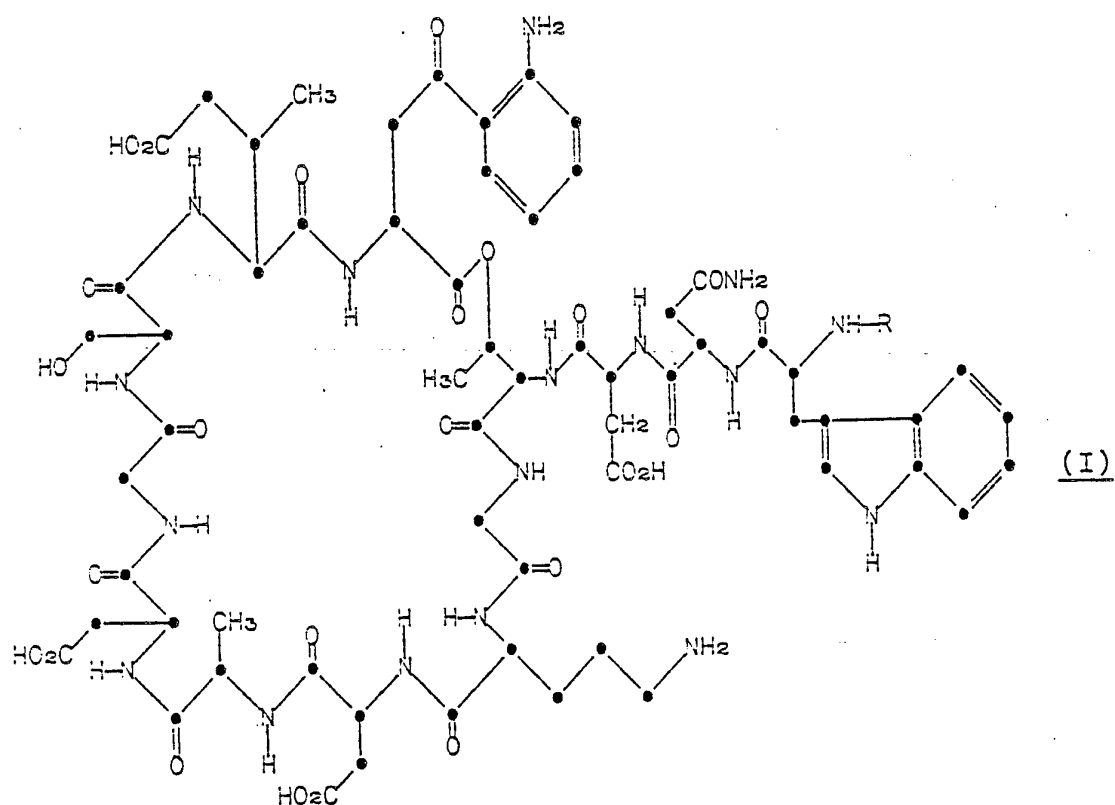
Způsob výroby antibiotika A-21978C ve formě komplexu nebo jeho faktorů.

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby antibiotika A-21978C ve formě komplexu nebo jeho faktorů a mikroorganismu produkujícího antibiotikum.

Dosavadní stav techniky

Skupina antibiotik A-21978C jsou výborná antibakteriální činidla a lze je vyjádřit obecným vzorcem I



Přirozeně se vyskytující A-21978C faktory popsané v US patentu č. 4 331 594 jsou faktory C_0 , C_1 , C_2 , C_3 , C_4 a C_5 . U faktorů C_1 , C_2 , C_3 , C_4 a C_5 je R ve vzorci I specifická alkanoylová skupina o 10 až 12 atomech uhlíku. A-21978C faktor C_0 , dříve považovaný za sloučeninu, která má jediný větvený alkanoylový postranní řetězec o 10 atomech uhlíku, byl rozpoznán jako směs dvou složek v poměru přibližně 2 : 1. Větší složka má větvený postranní řetězec o 10 atomech uhlíku, menší složka přímý postranní řetězec o 10 atomech uhlíku.

Všeobecně kultury izolované v přirozeném stavu ("divoký typ") produkují antibiotikum s nízkými výtěžky. Často je antibiotická produkce chybná. Kmeny mající zvýšenou schopnost a kmeny, které trvale produkují antibiotikum, jsou proto velmi hodnotné.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je způsob výroby komplexu antibiotika A-21978C ve formě komplexu nebo jeho faktorů pěstováním mikroorganismu v živném prostředí, obsahujícím využitelné zdroje uhlíku, dusíku a anorganických solí v submersní kultuře za aerobních podmínek, přičemž se v živném prostředí pěstuje *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998 nebo jeho mutanta, varianta nebo rekombinanta, produkující uvedené antibiotikum při teplotě 20 až 40 °C a pH 6,5 až 7,0, načež se popřípadě komplex antibiotika A-21978C oddělí a popřípadě se z komplexu izolují jeho jednotlivé faktory.

Streptomyces roseosporus kmen NRRL 15998 (A-21978.65), který rovněž tvoří podstatu vynálezu, je užitečným A-21978C produkující kulturou. Tato kultura je součástí sbírky zásobních kultur Severního regionálního výzkumného centra (Northern Regional Research Center, U.S. Department of Agriculture) Zemědělská výzkumná služba (Agricultural Research Service), Peoria, Illinois 61604, ve které je přístupna veřejnosti pod přírůstkovým číslem NRRL 15998.

Mikroorganismus byl označen A 21978.65. Tento kmen byl vyvinut kmenovou selekcí a mutací z kultury označené A-21978.6 (NRRL 11379). Kmen A-21978.6, který byl studován Frederikem P. Mertzem a Ralphem E. Kastnerem z Lilly Research Laboratories, byl vyvinut z rodičovského kmene z hory Arrarat v Turecku. Kmen A-21978.6 byl klasifikován jako nový kmen *Streptomyces roseosporus*, Falcao de Morias a Dalia Maia 1971. Tato klasifikace byla učiněna po srovnání s publikovanými popisy (R.E. Buchanan a N.E. Gibbons, "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", The Williams and Wilkins Company, 8. vydání 1974; a E.B. Shirling a D. Gottlieb, Cooperative Descriptions of Type Strains of *Streptomyces*", Intern. Journal of Systematic Bacteriology, 808-809, 1972).

Kultura *Streptomyces roseosporus* NRRL 11379 a podmínky pro její použití při výrobě A-21978C antibiotik je popsána Robertem L. Hamillem a Marvinem M. Hoehnem v U.S. patentu č. 4 331 594 zahrnutém zde jako odkaz.

Klasifikace byla založena na metodách doporučených pro Mezinárodní Streptomycetový projekt (E. B. Shirling a D. Gottlieb

"Methods of Characterisation of Streptomyces Species", Intern. Journal of Systematic Bacteriology 16, 313 - 340, 1966) současně s některými doplňkovými testy.

Využití uhlíku bylo stanoveno na ISP 9 basálním mediu, ke kterému uhlíkové zdroje byly přidány, aby vytvořily konečnou koncentraci, 1,0 %. Uhlíkové zdroje byly sterilizovány filtrací, basální medium bylo sterilizováno v autoklávu. Plotny byly odčítány po 14 dnech inkubace při teplotě 30 °C. Cukry buněčných stěn byly stanoveny s použitím modifikace metody podle Lechevaliera (M.P. Lechevalier, "Chemical Methods as Criteria for the Separation of Actinomycetes into Genera" pracovní setkání uspořádané pod patronací Podvýrobu aktinomycet Americké mikrobiologické společnosti Dr. Thomas O. Pridham, Convenor, konané na Institute of Microbiology, Rutgers University, The State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey, 1971. (Isomer diaminopimelové kyseliny byl stanoven s použitím metody Beckera a spol. - B. Becker et al., "Rapid Differentiation Between Norcadia and Streptomyces by Paper Chromatography of Whole Cell Hydrolysates", Appl. Microbiol. 11, 421 - 423, 1964). Analýza aminokyselin byla provedena s promytými fragmenty buněčných stěn. Melanoidní pigmenty byly určeny s použitím ISP 1 (Trypronový kvasinkový kultivační bujon ISP 6) peptonový kvasinkový železitý agar), ISP 7 (tyrosinový agar), ISP 7 modifikovaný (ISP 7 bez tyrosinu) a tyrosinovou zkouškou (Yuzuru Mikami a další, "Modified Arai and Mikami Melanin Formation Test of Streptomyces", Intern. Journal of Systematic Bacteriology, 27 (3). 290, 1977). Hydrolýza škrobu byla stanovena testováním přítomnosti škrobu jodem.

Teplotní rozsah tolerance chloridu sodného, rozsah pH a antibiotická citlivost byly provedeny s použitím ISP 2 agarového média. Rozsah teplot byl 25, 28, 30, 34, 37, 40, 45, 50 a 55 °C. Tolerance chloridu sodného byla měřena přidáním k agaru v podílu: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 a 12 %. Vzorky byly inkubovány při 30 °C. Rozsah pH byl měřen úpravou agaru od pH 3.0 až 11,0 při přírůstcích o 1,0 pH jednotku, právě před nasypáním. Antibiotická citlivost byla určena s použitím kotoučů uložených na naočkované agarové plotny.

Jména barev byla určena podle ISCC-NBS metody (K. L. Kelly a D. B. Judd, "The ISCC-NBS Methods of Designation Colors and a Dictionary of Color Names", U.S. Department of Commerce Circ. 553, Washington, D. C., 1955).

Číslice v závorkách odkazují na Tresnerovy a Backusovy barevné serie (H. D. Tresner and E. J. Backus, "System of Color Wheels for Streptomyces Taxonomy". Appl. Microbiol. 11, 335 - 338, 1956). Barevná typová označení jsou podtržena. Maerzovy a Paulovy barevné bloky jsou obsaženy v závorkách (A. Maerz a M. R. Paul, "Dictionary of Color", McGraw-Hill Book Company, Inc., New York, N. Y., 1950).

Morfologie

Morfologie kultury A-21978.6 je tvořena sporoforami, jež jsou Recturs-Flexibilis (RF) klasifikace. Řetězce spor mají více

než 10 spor na řetězec. Povrch spor je hladký.

Kultura A-21978.6 je charakterizována, a to vytvářením převážně červené vzdušné sporové masy s červenavěhnědou zadní stranou. Světle hnědý ve vodě rozpustný pigment je rovněž přítomen. Tyto charakteristiky jsou vykazovány na třech ze 14 agarových růstových prostředcích ISP 2, ISP 7, TPO. Tato tři prostředí jsou jediná, jež podporují abundanční vzdušný a vegetativní růst.

Dvě agarová růstová prostředí, ISP 4 a glukosoasparaginový agar, vytvářejí bílé až šedé vzdušné sporové hmoty se žlutou zadní stranou. Žádný ve vodě rozpustný pigment nebyl pozorován. Tato dvě media podporovala dobrý, ale ne abundanční vzdušný a vegetativní růst.

Devět dalších agarových růstových prostředí bylo užito, ale ty poskytovaly chudý až žádný růst a spolupráci. Barva vzdušného mycelia byla-li přítomna, byla v bílé až šedé sérii.

Melanoidní pigmenty jsou nepřítomny. Hlavními složkami buněčné stěny jsou: LL-DAP, glycin, glukóza a ribóza. To značí typ I buněčné stěny a typ C cukrového obrazu (R. E. Buchanan and N. E. Gibbons, Eds. "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" The Williams Willkins Company, 8th edition, 1974, str. 658).

Následujících pět kultur bylo porovnáno v laboratorních testech s A-21978.6:

Streptomyces albovinaceus ISP 5136, ATCC 15833

Streptomyces candidus ISP 5141, ATCC 19891

Streptomyces moderatus ISP 5529, ATCC 23443

Streptomyces roseosporus ISP 5122, ATCC 23958

Streptomyces setonii ISP 5395, ATCC 25497

Tyto kultury patří k bílé a červené barevným seriím, mají RF typ sporoforové morfologie, hladkou povrchovou ornamentaci spor a podle ISP popisů jsou melamin negativní a nemají zvláštní barvu zadní strany nebo ve vodě rozpustné pigmenty. Tyto vlastnosti, spolu s využitím uhlíku a ostatními druhotnými znaky odpovídají kultuře A-21978.6.

Když tyto kultury byly srovnány s A-21978.6 za laboratorních podmínek, čtyři byly zahrnuty. *S. candidus* a *S. setonii* vykazovaly žluté vzdušné sporové masy na mnohých médiích, čímž se odlišovaly od kultury A-21978.6. *S. albovinaceus* a *S. moderatus* vykazovaly tmavou odlišitelnou barvu zadní strany, ve vodě rozpustné pigmenty a produkovaly melanoidní pigmenty, které všechny byly odlišné od kultury A-21978.6. ISP popis *S. moderatus* vykazuje červenavě hnědou nebo silně hnědou barvu zadní strany, ale nevykazuje takové jaké jsou charakteristické pro *S. albovinaceus*. Žádná z kultur není uvedena jako melaminpositivní.

Kultura A-21978.6 byla proto klasifikována jako kmen *Streptomyces roseosporus*, Falcao de Morias a Dalia Maia 1961. Tato klasifikace je založena na srovnání s publikovanými popisy a přímým laboratorními srovnáními. Následující vlastnosti kultur sumarizují přímé srovnávací studie.

Vlastnosti kultur

Morfolofie

A21978.6

S. roseosporus

Sporophory přímé až zahnuté (RF), bez pozorovaných háčků, kliček nebo spirál. Řetězec spór > 10. Povrch spór hladký, jak bylo stanoveno běžnou elektronovou mikroskopií.

Spóry: podlouhlé až oválné

Průměr: 0,85 x 1,78 μM

Rozsah: 0,65 - 0,97 x

x 0,97 - 2,6 μM

podlouhlé až cylindrické

1,01 x 2,47 μM

0,97 - 1,3 x

x 1,63 - 3,25 μM

Vlastnosti kultur (pokračování)

A21978.6S. roseosporus

vzrůst	barva	vzrůst	barva
<u>řez mrkvi</u>			
vzdušný: dobrý	šedá (c) růžová	žádný	žádná
vegetativní: abundantní	hnědá	dobrý	žlutohnědá
žádný rozpustný pigment		žádný rozpustný pigment	
<u>řez bramboru</u>			
vzdušný: dobrý	šedá (c) růžová	žádný	žádná
vegetativní: abundantní		dosti značný	oranžově-hnědá
tmavohnědý rozpustný pigment	hnědá	žádný rozpustný pigment	

Vlastnosti kultur (pokračování)

A21978.6S. roseosporus

vzrůst

barva

vzrůst

barva

ISP // (Agar s tryptonem a extraktem z kvasnic)

vzdušný: dosti značný
 vegetativní: dobrý
 žádný
 rozpustný
 pigment

(W) a bílá
 [10A1] bledě chudý
 žlutozelená chudý
 žádný rozpustný
 pigment

(W) a bílá
 [1082] bledě
 žlutozelená

ISP // (Agar s extraktem z kvasnic a sladu

vzdušný: abundantní

(R) 50b gy. abundantní

(R) 3cs bledě
oranžovožlutá

vegetativní: abundantní
 světlehnědý
 rozpustný pigment

žlutorůžová
 [5D10] 1t. abundantní
 červenohnědá světlehnědý rozpustný
 pigment

12L7 1t.
 olivově hnědá

Vlastnosti kultur (pokračování)

A21978.6S. roseosporus

vzrůst

barva

vzrůst

barva

ISP // (Agar s ovesnou moukou)

vzdušný: dosti značný

(W) a bílá chudý(W) a bílá

vegetativní: dosti značný

[10A2] bledě žlu- dosti značný

bledě zelenavě šedá

světelnědý

torůžová žádný rozpustný

rozpustný pigment

pigment

ISP // (Agar se škrobem a anorganickými solemi)

vzdušný: dobrý

(W) b bílá dobrý(R) 3c2 bledě

vegetativní: dobrý

[10B1] bledě žlu- abundantní

[1115] šedavě žlutá

tozelená

světelnědý roz-

žádný rozpustný

pustný pigment

pigment

Vlastnosti kultur (pokračování)

A21978.6S. roseosporus

vzrůst	barva	vzrůst	barva
<u>ISP (Glycerol-asparaginový agar)</u>			
vzdušný: dosti značný	(W) 13ba na- fialověle bílá	dosti značný	(W) b bílá
vegetativní: dobrý	[3B7] gy. žlu- torůžová	dobrý	[10C2] šedavě žlutá
růžový rozpustný pigment		světlehnědý rozpustný pigment	
<u>ISP (Tyrosinový agar)</u>			
vzdušný: abundantní	(R) 5cb žlu- torůžová	abundantní	(R) 5cb gy. žlu- torůžová
vegetativní: abundantní	[7L12] mod. červenohnědá	abundantní	[11E5] žlutohnědá
tmavohnědý rozpustný pigment		světlehnědý rozpustný pigment	

Vlastnosti kultur (pokračování)

A21978.6S. roseosporus

vzrůst	barva	vzrůst	barva
<u>Bennettův modifikovaný agar</u>			
vzdušný: žádný	---	abundantní	(R) 5cb šedožlutá torůžová
vegetativní: chudý	bledě žlutá tónědá	abundantní	[11D4] šedavě žlutá
žádný rozpustný pigment		světlehnědý rozpustný pigment	
<u>Jablečnovápenatý agar</u>			
vzdušný: žádný	---	chudý	(W) a bílá
vegetativní: dosti značný	[7L12] mod.	chudý	bleděžlutozelená
světlehnědý rozpustný pigment	červenohnědý	bleděžlutozelený rozpustný pigment	

Vlastnosti kultur (pokračování)

A21978.6S. roseosporus

barva

vzrůst

barva

vzrůst

Agar s Czapkovým roztokem

vzdušný: chudý

žádný

vegetativní: chudý

žádný

žádný rozpustný pigment

Emersonův agar

vzdušný: chudý

abundantní

(R) 5cb gy. žlu-

torůžová

vegetativní: abundantní

abundantní

[1115] gy. žlutá

žádný rozpustný pigment

světlehnědý rozpustný pigment

Vlastnosti kultur (pokračování)

A21978.6S. roseosporus

vzrůst	barva	vzrůst	barva
<u>Glukoso-asparaginový agar</u>			
vzdušný: dobrý	(W) b bílá	dosti značný	(W) b bílá
vegetativní: dobrý	[12B2] gy. žlutá	dobrý	[12B2] bleděžlu- tozelená
žádný rozpustný pigment		žádný rozpustný pigment	
<u>Glycerol-glycinový agar</u>			
vzdušný: chudý	---	abundantní	(W) b bílá
vegetativní: abundantní	[8L12] tma- vá gy. hnědá	abundantní	[10G3] světle- žlutá
hnědý rozpustný pigment		světlehnědý rozpustný pigment	

Vlastnosti kultur (pokračování)

A21978.6S. roseosporus

vzrůst	barva	vzrůst	barva
<u>Živný agar</u>			
vzdušný: žádný	---	dostí značný	(W) <u>b</u> bílá
vegetativní: chudý	blédě žlu- tohnědá	dobrý	bleděžlutošedá
žádný rozpustný pigment		žádný rozpustný pigment	

Agar s protlakem z rajčat a ovesnou moukou

vzdušný: abundantní	(R) <u>5cb</u> gy.	abundantní	(R) <u>5cb</u> gy žluto- růžová
vegetativní: abundantní	[8L12] dk. gy.	abundantní	[12L7] žluto- hnědá
hnědý rozpustný pigment		hnědý rozpustný pigment	

Utilizace uhlíku

Substrát	A21978.6	S.roseosporus
L-arabinosa	+	+
D-fruktosa	+	-
D-galaktosa	+	+
D-glukosa	+	+
i-Inositol	-	-
D-Mannitol	+	-
D-rafinosa	-	-
L-rhamnosa	+	+
Salicin	+	+
Sacharosa	-	-
D-xylosa	+	+

Klíč:

+ = pozitivní utilizace

- = negativní utilizace

V l a s t n o s t	A21978.6	S.roseosporus
Melanoidní pigmenty		
ISP 1 (prostředí s tryptonem a extraktem z kvasnic)	-	-
ISP 6 (prostředí s peptonem, železem a extraktem z kvasnic)	-	-
ISP 7 (tyrosinový agar)	-	-
ISP 7 mod. (ISP 7 bez tyrosinu)	-	-
Tyrosinová zkouška	-	-
Zkapalnění želatiny	+	+
Působení na odstředěné mléko	lehká hydrolysa	lehká hydrolysa
Hydrolysa škrobu	+	+
pH rozmezí	5 - 11	5 - 11
teplotní rozmezí	25 - 40 °C	25 - 45 °C
redukce nitrátů	-	+
NaCl-tolerance; růst až do	10 %	6 %

Citlivost na antibiotika

Antibiotikum	Koncentrace DISK	Třída	A21978.6	S.roseosporus
Erythromycin	15 µg	makrolidová	+	+
Cephalothin	30 µg	β-laktamová	+	+
Liscomycis	2 µg	glykosidová	-	-
Nystatin	100 jedn.	polyenová	-	-
Polymyxin B	300 jedn.	peptidová	+	-
Streptomycin	10 µg	aminoglykosidová	+	+
Tetracyklin	30 µg	tetracyklinová	+	+
Vascomycin	30 µg	glykopeptidová	+	+

CS 276983 B6

16

+ = sensitivní (zóny inhibice)

- = resistantní (žádné zóny inhibice)

Jisté vlastnosti kmene A-21978.6 se liší od vlastností publikovaných pro *S. roseosporus*. Kultura A-21978.6 se odlišuje od publikovaných kmenů velikostí spor, vzrůstem na bramboru a mrkvi, NaCl tolerancí a v redukci nitrátů.

A-21978.65 kmen podle tohoto vynálezu má identifikační vlastnosti kmene kmene A-21978.6, ale liší se od něj v množství produkovaného antibiotika A-21978.6. Předchozí kmen při nejlepším produkoval ne více než 100 µg antibiotika A-21978C na ml fermentačního media. Zlepšený A-21978.65 kmen podle tohoto vynálezu produkuje nejméně 2,5 x větší množství při fermentaci v tancích a produkoval více než 18 při fermentaci v třepacích lahvích. S touto zvýšenou A-21978C produkující vlastností nový kmen poskytuje značně zlepšenou metodu k získání těchto antibiotik.

Tak jako je to běžné i u ostatních organismů, vlastnosti nové A-21978C produkující kultury podle tohoto vynálezu, *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998 podléhají změnám. Rekombinanty, varianty a mutanty kmene NRRL 15998 mohou být získány různými mutageny jako ultrafialovými paprsky, X-paprsky, vysokofrekvenčními vlnami, radioaktivním zářením a chemikáliemi. Přirozené a indukované varianty, mutanty a rekombinanty *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998, které si podržují vlastnost produkce antibiotik A-21978C ve vysokém výtěžku, mohou být rovněž použity při provádění způsobu podle vynálezu.

Živné prostředí, užitá ke vzrůstu *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998 kultury, může být kterékoliv z řady médií. Pro ekonomii ve výrobě, optimální výtěžek a snadnost izolace produktu jsou však jistá kultivační média preferována. Tak například preferovaným zdrojem uhlíku při fermentaci ve velkém měřítku je tapiokový (západoindické ságo), dextrin, ačkoliv glukosa, fruktosa, galaktosa, maltosa, manna, olej z bavlněných semen, methyloleát, glycerol, čištěný sojový olej a podobně mohou být užity rovněž. Preferovaným zdrojem dusíku je enzymaticky hydrolyzovaný kasein, ačkoliv rozpustný masový pepton, sojová mouka, sojový hydrolyzátní, sojová krupice, kvasinky, aminokyseliny jako L-asparagin a DL-leucin a podobné jsou rovněž užitečné. Živné anorganické sole, jež mohou být zahrnuty do kultivačního média, jsou rozpustné sole poskytující draslík, amoniumchlorid, sulfát, nitrát a podobné ionty. Mezi nimi K_2SO_4 je zejména užitečný pro produkci antibiotika. Melasový popel, popelový dialysát a syntetická minerální směs jsou rovněž užitečné.

K výrobě antibiotika A-21978C je výhodné používat destilovanou nebo deionizovanou vodu do fermentačního media. Některé minerály ve vodě z vodovodu, jako je například kalcium a uhličitany, znesnadňují výrobu antibiotika.

Základní stopové prvky jsou také nezbytné pro růst a vývoj organismu a musí být zavzaty do kultivačního media. Takové stopové prvky obecně se objevují jako nečistoty v ostatních složkách média v množství dostatečném splnit růstové požadavky organismu.

Přidání malého množství (např. 0,2 ml/litr) protipěnového činidla, jakým je propylenglykol, k fermentačnímu mediu ve velkém může být nezbytné, když pění začne vytvářet těžkosti.

K výrobě velkých množství antibiotika A-21978C je s výhodou používáno submersní aerobní fermentace v tancích. Malá množství antibiotik A-21978C mohou být získána z kultur v třepacích lahvích. Pro časové zpoždění v produkci antibiotika běžně spojeného s inokulací velkých tanků sporovou formou organismu je lepší použít vegetativní inokulum. Vegetativní inokulum se připraví inokulací malého objemu kultivačního média sporovou formou nebo myceliálními fragmenty organismu získanými z čerstvých, aktivně rostoucích kultur organismu. Vegetativní inokulum se pak přenese do větších tanků.

Nový A-21978C produkující organismus, může být pěstován při teplotách mezi 20 °C až do 40 °C. Optimální produkce antibiotika A-21978C je při teplotách 30 až 32 °C.

Jak je obvyklé při aerobním submersním kultivačním způsobu je sterilní vzduch proháněn kultivačním prostředím. K účinné produkci antibiotik A-21978C procento saturace vzduchem pro výrobu v tancích musí být nad 20 %, přednostně nad 30 % při 30 °C a atmosférickém tlaku.

Pro fermentaci v tanku je výhodné udržovat pH fermentačního média v rozsahu 6,5 až 7,0. To se dosáhne přidáním přiměřených množství, například hydroxidu sodného (v časových stadiích) a chlorovodíkové kyseliny (v pozdějších stadiích).

Výroba antibiotik A-21978C může být sledována v průběhu fermentace testováním vzorků média nebo extraktů mycelia na antibiotickou účinnost proti mikroorganismům, jež jsou na tato antibiotika citlivá. Jedním zkušebním mikroorganismem užitečným v testování těchto antibiotik je *Micrococcus luteus*. Biologická titrace je s výhodou prováděna pomocí stanovení papírovými disky na agarových plotnách.

Druhou možností je, že pevné části kultury počítaje v to složky média a myselium, mohou být užity bez extrakce nebo separace, ale s výhodou po odstranění vody, jako zdroj antibiotik A-21978C. Například po prokázání A-21978C antibiotické aktivity kultivační medium může být sušeno lyofylisací a namícháno přímo do přísady do krmiva.

Sloučeniny vzorce I jsou výtečné antibakteriální látky.

Vynález bude osvětlen následujícími příklady:

Příklad 1

Produkce komplexu A-21978C

Zásobní kultura se připraví a udržuje v parní fázi kapalného dusíku. *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998, udržovaný v parní fázi kapalného dusíku se užije k naočkování 50 ml vegetativního živného prostředí následujícího složení:

složka	množství %
sojový bujon s tryptikázou ^x	3,0
Dextrin	2,5
voda (deionizovaná)	94,5

^xBaltimore Biological Laboratories, Cockeysville MD.

Naočkované živné prostředí se inkubuje v Erlenmeyerových baňkách při teplotě 30 °C celkem 48 hodin na rotační třepačce s výkyvem 5 cm při 250 otáčkách/min. Zralá vegetativní kultura se rozdělí do většího počtu nádobek po 0,5 ml a nádoby se skladují v parné fázi kapalného dusíku.

K získání většího množství stejnorodého materiálu se užije 1 ml kultury, skladované v kapalném dusíku k naočkování 80 ml svrchu uvedeného živného prostředí. Naočkované vegetativní prostředí se inkubuje v Erlenmeyerových baňkách o objemu 250 ml celkem 48 hodin při teplotě 30 °C na rotační třepačce o výkyvu 5 cm při 250 otáčkách/min.

10 ml takové kultury bylo užito k inokulaci 450 ml druhostupňového vegetativního růstového prostředí, které má stejné složení jako primární svrchu popsané vegetativní prostředí. Druhostupňové vegetativní prostředí bylo inkubováno v 2-litrových Erlenmeyerových lahvích po dobu 24 hodin při teplotě 30 °C na rotační třepačce rotující s výkyvem 5 cm při 250 otáčkách za minutu.

Jeden litr druhostupňové vegetativní kultury byl užit k inokulaci 39 litrů sterilního terciárního prostředí pro získání očkovací kultury s následujícím složením:

složka	množství (%)
sojová mouka	0,5
extrakt z kvasnic ^a	0,5
kalciumglukonát	1,0
KCl ^b	0,02
MgSO ₄ .7H ₂ O ^b	0,02
FeSO ₄ .7H ₂ O ^b	0,0004
Sag 471 (protipěnové činidlo) ^c	0,03
voda	979.296

^aDifco Laboratories, Detroit MI

^bStopové prvky byly připraveny takto:

FeSO₄.7H₂O (7,6 g) byl rozpuštěn v konc. HCl (76 ml).

MgSO₄.7H₂O (380 g), KCl (380 g) a deionisovaná vodou byly přidány do celkového objemu 3800 ml. Aby se získaly specifikované minerály, použije se 80 ml roztoku na 39 litrů terciárního stupně.

^cUnion Carbide, Danbury CT.

Inokulované prostředí bylo inokulováno 24 hodin v nádobě z nerezavé oceli při teplotě 30 °C. Prostředí bylo provzdušňováno sterilním vzduchem rychlostí 0,85 objemu na objem prostředí za minutu a mícháno běžným míchadlem při 250 otáčkách za minutu. Tlak v nádobě byl udržován na hodnotě 35 kPa.

Jeden litr inkubovaného terciárního stupně byl použit k inokulaci 119 litrů steriličního výrobního prostředí následujícího složení:

složka	množství (%)
sojová mouka	2,2
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,066
dextróza	0,825
Sag 471	0,022
bramborový dextrin	3,3
melasa (blackstrap)	0,275
voda z vodovodu	93.312

pH bylo upraveno na 7,0 po přidání prvních dvou složek a potom opět po přidání všech složek bezprostředně před sterilizací.

Naočkované výrobní prostředí bylo inkubováno 6 dní v nerezové ocelové nádobě při 30 °C a provzdušňováno sterilním vzduchem rychlostí 0,5 objemu na objem prostředí (min.). Medium bylo protřepáváno konvenčními míchadly při 250 otáčkách/min. od 0 do 15 hodin a při 350 otáčkách/min. po 15 hodinách. pH bylo udržováno na nebo nad 6,5 přidáváním roztoku hydroxidu amonného. Výtěžek A21978C komplexu byl 0,282 g na litr media na konci fermentace. Faktor distribuce je popsán v tabulce 1.

Tabulka 1

Vliv různých lipidových substrátů na produkci A-21978C

		A-21978C ($\mu\text{g/ml}$) ^{a,b}									
Příklad	Lipidový substrát	C ₁	C ₂	C ₃	C ₅	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁		
1	žádný	77	113	72	7	-	-	12 ^c	-		
2	kaprylová kyselina	276	312	214	175	113	-	170	-		
3	nonanová kyselina	147	177	125	192	-	83	90	-		
4	kaprinová kyselina	135	50	48	77	-	-	1530 ^d	-		
5	ethylester kyseliny kaprinové	168	246	156	251	-	-	202 ^d	-		
6	amoniumdekanóat	335	371	228	98	-	-	739 ^d	-		
7	undekanová kyselina	163	206	158	273	-	-	118	700		
8	laurová kyselina	204	236	141	372	-	-	173	-		

^aKoncentrace složek ve zfiltrovaném prostředí byla stanovena vysokotlakou kapalinovou chromatografií, jednotlivé složky byly prokazovány absorpcí v ultrafialovém světle.

^bC₀, C₁, C₂, C₃ a C₅ = přírodně se vyskytující 2-21978C faktory;
C₈, C₉, C₁₀ a C₁₁ = sloučeniny vzorce I, kde R = C₈, C₉, C₁₀
a C₁₁ - acylové skupiny.

^cpřírodní faktor C₀

^df jde zejména o R = n-dekanoyl.

Příklad 2

Výroba komplexu A-21978C v třepacích lahvích

Obecný postup popsáný v příkladu 1 je použit, ale za podmínek použití třepacích lahví s následujícím fermentačním médiem:

složka	množství (g/litr)
glukóza	7,5
dextrin ^a	30
enzymatický hydrolyzovaný kasein ^b	5
pepton ^c	5
melasa	2,5
deiontovaná voda	až do 1 litru

^a Stadex 11, A. E. Staley Co., Decatur 1L

^b NZ Amine A, Humko Sheffield Chemical, Lyndhurst NJ

^c Biosate, Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville ND.

Výtěžek komplexu A-21978C z této fermentace byl 1800 µg na ml kultivačního média.

Biologická účinnost jednotlivých faktorů antibiotika A 21978 bude uvedena v následujících tabulkách, kde v Tabulce 2 je uvedena minimální inhibiční koncentrace /MIC/ pro anaerobní organismy, v Tabulce 3 MIC pro aerobní mikroorganismy, v Tabulce 4 je shrnuto srovnání účinnosti in vivo a in vitro proti některým aerobním mikroorganismům a v Tabulce 5 je uvedena toxicita těchto látek pro myš a krysu.

Tabulka 2

Organismus /anaerobní/	MIC / μ g/ml/						Kom- plex
	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	
<i>Actinomyces israelii</i>	2	4	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
<i>Clostridium perfringens</i>	2	16	8	8	1,0	0,5	8
<i>Clostridium septicum</i>	4	4	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	4	16	8	4	2	0,5	8
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i>	4	4	2	1,0	1,0	0,5	1,0
<i>Peptococcus prevoti</i>	4	2	1,0	<0,5	2	0,5	<0,5
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0,25	2	1,0	1,0	0,25	0,25	1,0
<i>Peptostreptococcus intermedius</i>	2	4	1,0	<0,5	1,0	0,25	1,0
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	8	2	1,0	0,5	0,25	2
<i>Bacteriodes fragilis</i>	>128	>128	>128	>128	>128	>128	>128
<i>Fusobacterium symbiosum</i>	4	>128	>128	16	4	2	>128
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	2	64	64	32	4	0,5	>128

Tabulka 3

Organismus /aerobní/	Komplex	MIC /µg/ml/					
		C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
Staphylococcus aureus 3055	0,13	1,0	0,5	0,13	0,06	0,25	0,13
Streptococcus 282 D	0,25	2,0	1,0	0,25	0,13	1,0	0,13
Streptococcus pyogenes C203	0,13	0,25	0,13	0,13	0,25	0,13	0,06
Streptococcus pneumoniae Park I	0,13	0,5	0,13	0,25	0,13	0,5	0,06
Viridans Streptococcus 9943	0,5	1,0	0,5	1,0	0,5	1,0	0,13
Neisseria gonorrhoeae 111076-4	8,0	NT+	16,0	4,0	4,0	NT	NT

NT = netestováno

Tabulka 4

Srovnání účinku in vitro a in vivo

Anti-bioticum	MIC ¹	ED ₅₀ ²	MIC	ED ₅₀ ²	ED ₅₀ ³	MIC	ED ₅₀ ²
A21978C ₁	0,5	0,22	0,13	0,064	93	0,13	0,3
A21978C ₂	0,13	0,16	0,13	0,032	59	0,13	0,14
A21978C ₃	0,06	0,08	0,06	0,032	66	0,03	0,09
A21978C ₀			0,25	0,16		0,5	0,88
A21978C ₄			0,13	0,10		0,5	0,36
A21978C ₅			0,06	0,053		0,06	0,17
A21978C	0,13	0,18	<0,03	0,043		0,13	0,1
komplex Erythromycin	0,13	0,5	0,13	0,64		0,5	7,3

¹ MIC = minimální inhibiční koncentrace v $\mu\text{g/ml}$ v ředění na agaru

² podkožně

³ perorálně

Tabulka 5

Toxicita A-21978C

LD_{50} /mg/kg/

A-21978C	Myš IV	SC	Krysa IV
Faktor C ₁	> 250	> 365	479 ± 32
Faktor C ₂	150 - 250	175	204 ± 17
Faktor C ₃	< 50	70 - 75	< 160
Komplex	150	175 - 190	169 ± 10

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby komplexu antibiotika A-21978C ve formě komplexu nebo jeho faktorů pěstováním mikroorganismu v živném prostředí, obsahujícím využitelné zdroje uhlíku, dusíku a anorganických solí v submersní kultuře za aerobních podmínek, vyznačující se tím, že se v živném prostředí pěstuje *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998 nebo jeho mutanta, varianta nebo rekombinanta, produkující uvedené antibiotikum při teplotě 20 až 40 °C a pH 6,5 až 7,0, načež se popřípadě komplex antibiotika A-21978C oddělí a popřípadě se z komplexu izolují jeho jednotlivé faktory.
2. Biologicky čistá kultura *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998 nebo její mutanta, varianta nebo rekombinanta.
3. *Streptomyces roseosporus* NRRL 15998.

Konec dokumentu
