



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 06.11.76 (P. 193533)

Pierwszeństwo _____

Zgłoszenie ogłoszono: 08.05.78

Opis patentowy opublikowano: 16.07.1979

Int. Cl.² C12D 9/20

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Marian Tyc, Teodora Kadzikiewicz, Alicja
Tomczyk, Jadwiga Zakrzewska, Paweł Galewski,
Krystyna Taflńska, Hanna Zaorska, Eugeniusz
Gajowiak

Uprawniony z patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego,
Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania bacytracyny do celów paszowych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania bacytracyny do celów paszowych metodą mikrobiologiczną.

Bacytracyna jest antybiotykiem polipeptydowym wytwarzanym przez szczepy z rodzaju *Bacillus*. Antybiotyk ten znalazł szerokie zastosowanie w żywieniu zwierząt jako dodatek do pasz. W medycynie ludzkiej i weterynaryjnej stosowany jest w małym zakresie, przede wszystkim w leczeniu miejscowym. Niewielka ilość bacytracyny dodana do pasz dla drobiu, trzody chlewnej i bydła umożliwia w tym samym czasie przy użyciu tej samej, a nawet mniejszej ilości paszy uzyskanie zwiększonego przyrostu wagi ciała zwierząt.

Znane są sposoby wytwarzania bacytracyny na drodze fermentacji głębinowej przy użyciu szczepów *Bacillus subtilis* i *Bacillus licheniformis*. Szczepy wykorzystywane w produkcji charakteryzują się wysoką zdolnością wytwarzania bacytracyny, lecz wadą ich jest tworzenie endospor w czasie biosyntezy antybiotyku oraz wrażliwość wobec bakteriofagów, które przenikają przez filtry bakteryjne niszcząc komórki drobnoustroju, wytwarzającego antybiotyk.

W przemyśle antybiotycznym występują dwa rodzaje inwazji bakteriofagowej: ostra i chroniczna. Pierwsza w wywołana jest przez bakteriofagi zjadliwe (wirulentne), powodujące gwałtowną lizę (rozpuszczenie) komórek szczepu produkcyjnego, wskutek czego nie uzyskuje się w ogóle antybiotyku w płynie fermentacyjnym. Inwazja chroniczna wywołana jest przez bakteriofagi łagodne, które niszczą tylko pewną część komórek, wytwarzających antybiotyk, co pociąga za sobą znaczne obniżenie wydajności

2

procesu biosyntezy antybiotyku. Inwazje bakteriofagowe ostre, a przede wszystkim chroniczne zakłócają rytm działalności produkcyjnej i powodują duże straty w produkcji antybiotyków, wytwarzanych przez drobnoustroje rodzaju *Bacillus* (S. G. Bradley: *Bacteriophages, their industrial significance*, Progress in Industrial Microbiology, 1968 str. 42).

Powszechnie stosowana metoda otrzymywania preparatów antybiotyku do celów paszowych polega na suszeniu całej hodowli drobnoustroju w suszarce rozpyłowej. W przypadku bacytracyny, która jest wytwarzana przez szczepy z rodzaju *Bacillus*, preparaty paszowe, otrzymane wyżej wspomnianą metodą, zawierają żywe przetrwalniki (endospory) szczepu produkcyjnego. Przetrwalniki bakteryjne odznaczają się wyjątkową opornością na czynniki fizykochemiczne. Są one najbardziej wytrzymałymi na podwyższoną temperaturę układami żywymi, znoszącymi temperatury powyżej 100°C. W procesie suszenia hodowli bakteryjnej, zawierającej bacytracynę, stosuje się temperatury, które zabijają formy wegetatywne szczepu produkcyjnego, lecz nie działają lub tylko w nieznacznym stopniu działają na formy ciepłooporne (endospory). Zastosowanie podczas suszenia wyższych temperatur nie jest wskazane ze względu na termolabilność biologicznie czynnej substancji. W celu zabicia form przetrwalnych szczepu produkcyjnego, występujących w produkcie finalnym, zachodzi potrzeba stosowania dodatkowych kosztownych operacji, takich jak np. naświetlanie promieniami γ.

Obecnie stwierdzono, że bacytracynę można wytwarzać przy użyciu szczepów fagoopornych, odznaczających się

wysoką aktywnością antybiotyczną i równocześnie niezdolnych w ogóle do tworzenia przetrwalników bakteryjnych.

Celem wyizolowania takich mutantów zawiesinę szczepu produkcyjnego, otrzymanego sposobem opisanym w opisie patentowym nr 90102, poddaje się działaniu czynników mutagennych, np. promieni UV i następnie inkubuje z dodatkiem zawiesiny bakteriofaga, wyizolowanego znanymi metodami z hodowli produkcyjnej. Spośród pojedynczych kolonii, wyrosłych na podłożu agarowym w miejscach wystąpienia lizy bakterii wrażliwych, wyosabia się mutanty o właściwościach wyżej podanych.

Szczepy fagooporne i równocześnie asporogenne, odznaczają się dużą zdolnością wytwarzania antybiotyku. Asporogenność u tych szczepów jest wynikiem mutacji, polegającej na wypadnięciu polinukleinowych odcinków genomu, kontrolujących proces sporulacji. Takie mutacje charakteryzują się między innymi niezdolnością do rewersji. Potwierdziły to wyniki setek wysiewów hodowli, ogrzewanych w temperaturze 75°C w ciągu 15 minut oraz ujemne próby otrzymania rewertantów przy użyciu różnych czynników mutagennych.

Nieoczekiwaną zaletą otrzymanych mutantów jest wytwarzanie dużych ilości bacytracyny na prostych i tanich pożywkach. W hodowli kolbowej na trzęsawce wydajność procesu biosyntezy jest rzędu 500 j/ml bacytracyny.

Zastosowanie w produkcji bacytracyny mutantów fagoopornych, niezdolnych w ogóle do tworzenia endospor, zapobiega z jednej strony inwazji bakteriofagowej, z drugiej całkowicie eliminuje występowanie endospor we wszystkich etapach produkcyjnych. Ułatwia to proces wytwarzania bacytracyny i przyczynia się do obniżenia kosztów produkcji. Dalsze korzyści, chociaż niewymierne, związane są z usunięciem niebezpiecznego źródła zakażeń dla innych procesów mikrobiologicznych, prowadzonych równocześnie w zakładzie produkcyjnym (np. wytwarzanie hormonów, witamin, aminokwasów, antybiotyków) oraz niebezpiecznego rozsiewania się dużej liczby przetrwalników bakteryjnych tego samego drobnoustroju do naturalnego środowiska człowieka.

Głębiny hodowle szczepu produkcyjnego, nie zawierające w ogóle przetrwalników bakteryjnych, są dogodnym materiałem do otrzymywania preparatów bacytracyny do celów paszowych. Za pomocą prostej metody suszenia całej hodowli bakteryjnej, która nie daje ścieków i odpadów, otrzymuje się bez dodatkowych kosztownych operacji produkt, nie zawierający w ogóle form przetrwalnych szczepu produkcyjnego.

Otrzymane przez nas szczepy fagooporne i asporogenne, niezdolne do rewersji, wykazują stabilność pod względem cechy wytwarzania antybiotyku, łatwa jest ich hodowla i są użyteczne w produkcji bacytracyny. Kilkakrotne pasażowanie i przechowywanie hodowli w formie wegetatywnej w temperaturze 2°—4°C w ciągu kilkunastu dni oraz przechowywanie w postaci zliofilizowanej nie wywierało ujemnego wpływu na aktywność antybiotyczną i inne właściwości, korzystne dla produkcji. Otrzymane mutanty można rozmnażać na podłożu agarowym, zawierającym różne źródła azotu, np. pepton, wyciąg mięsny i inne wyciągi roślinne i zwierzęce. Źródłem węgla mogą być cukry proste lub wielocukry. Ponadto podłoże agarowe może zawierać dodatki soli mineralnych i soli kwasów organicznych oraz mikroelementy.

Według wynalazku sposób wytwarzania bacytracyny do celów paszowych prowadzi się przy użyciu szczepów fago-

opornych i asporogennych, niezdolnych do rewersji, należących do rodzaju *Bacillus*, na pożywkach płynnych, zawierających przyswajalne źródło węgla i azotu oraz sole mineralne i kwasy organiczne, w temperaturze poniżej 40°C, korzystnie w temperaturze 31°—35°C, przy równoczesnym mieszanii i napowietrzaniu, w czasie potrzebnym do wytworzenia bacytracyny w hodowli, do której dodaje się następnie substancję stabilizującą aktywność antybiotyczną bacytracyny, taką jak np. siarczan cynkowy, po czym całą hodowlę suszy się w suszarce rozpyłowej, otrzymując preparat bacytracyny do celów paszowych, nie zawierający w ogóle endospor szczepu produkcyjnego.

W płynnych pożywkach produkcyjnych jako źródło azotu stosuje się odtuszczonej mąkę sojową, wyciągi i hydrolizaty z mąki sojowej, mąkę z nasion słonecznikowych, mąkę z orzeszków ziemnych, mąkę rzepakową, mąkę rybną, drożdże, wyciąg namokowy kukurydzy i/lub siarczan amonowy i azotany.

Spośród źródeł węgla stosuje się rozpuszczalne i nierozpuszczalne węglowodany, np. glukozę techniczną, sacharozę i inne cukry proste lub ich mieszaniny, skrobię, mąkę ziemniaczaną lub ich mieszaniny z wymienionymi uprzednio cukrami prostymi. Ponadto pożywki płynne wzbogaca się różnymi solami mineralnymi, i kwasami organicznymi, takimi jak kwas mlekowy, kwas octowy, kwas glukonowy, oraz mikroelementami.

Wyjściowym materiałem szczepiennym do procesu wytwarzania bacytracyny są hodowle szczepu produkcyjnego, np. szczepu U 3/F 3, inkubowane w temperaturze 34°C w ciągu 42 godzin na skośnym agarze lub liofilizaty szczepu, przygotowane w odpowiednich nośnikach, np. mleku odtuszczonym. Pożywkę produkcyjną szczepi się hodowlą posiewową, przygotowaną na pożywce płynnej. W zależności od potrzeby objętość inoculum zwiększa się, prowadząc dwu- lub więcej stopniową hodowlę posiewową. Biosyntezę bacytracyny prowadzi się w pożywkach płynnych w aparaturze, powszechnie stosowanej w przemyśle fermentacyjnym.

Dalsze szczegóły, dotyczące sposobu postępowania, znajdują się w przykładzie, który służy do objaśnienia, ale nie ogranicza wynalazku.

P r z y k ł a d. Stadium posiewowe I. Kolby Erlenmayera o pojemności 500 ml, zawierające po 30 ml pożywki posiewowej „K” lub pożywki produkcyjnej „P” o składach niżej podanych, szczepi się dwudniową hodowlą, zebraną z agaru skośnego szczepu fagoopornego i asporogennego, niezdolnego do rewersji, np. szczepu U-3/F-3 i stawia na trzęsawkę obrotową o 240 obr./min. Inkubacja trwa 18 godzin w temperaturze 33°C. Otrzymana w ten sposób hodowla służy jako inoculum dla stadium posiewowego II.

Skład pożywki posiewowej „K”:

mąka ziemniaczana	2,0%
drożdże paszowe	0,5%
kwas mlekowy	0,9%
CaCO ₃	0,3%
KH ₂ PO ₄	0,02%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2%
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,02%
MnSO ₄ · 5 H ₂ O	0,01%
woda wodociągowa do 100 ml	

5

Sterylizacja: 117°C w ciągu 30 minut, pH = 6,7—6,9 po sterylizacji.

Skład pożywki produkcyjnej „P”:

odtłuszczona mąka sojowa	4,8%
mąka ziemniaczana	2,0%
CaCO ₃	0,3%
kwas mlekowy	1,1%
KH ₂ PO ₄	0,01%
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,03%
MnSO ₄ ·5 H ₂ O	0,01%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2%

woda wodociągowa do 100 ml

Sterylizacja: 117°C w ciągu 30 minut, pH = 6,8—7,0 po sterylizacji.

Stadium posiewowe II. Do kolb Erlenmayera o pojemności 500 ml, zawierających po 30 ml pożywki produkcyjnej „P” lub pożywki posiewowej „K-2” o składzie niżej podanym, dodaje się po 0,3 ml hodowli stadium posiewowego. Inkubację prowadzi się w temperaturze 34°C na trzęsawce obrotowej o 240 obr./min. w ciągu 16 godzin.

Skład pożywki posiewowej „K-2”:

mąka sojowa odtłuszczona	3,0%
mąka ziemniaczana	2,0%
kwas mlekowy	1,0%
CaCO ₃	0,3%
KH ₂ PO ₄	0,01%
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,03%
MnSO ₄ ·5 H ₂ O	0,01%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2%

woda wodociągowa do 100 ml

6

Sterylizacja: 117°C w ciągu 30 minut, pH = 6,7—7,0 po sterylizacji.

Stadium produkcyjne. Do kolb Erlenmayera o pojemności 500 ml, zawierających po 30 ml pożywki produkcyjnej „P”, dodaje się 0,4 ml hodowli stadium posiewowego II. Biosyntezę bacytracyny prowadzi się w temperaturze 34°C na trzęsawce obrotowej o 240 obr./min. Po zakończeniu fermentacji odpowiednio koryguje się wartość pH hodowli i dodaje substancji stabilizującej aktywność antybiotyczną bacytracyny, np. ZnSO₄·7 H₂O w takiej ilości, aby stężenie cynku w preparacie wynosiło 3,5—8,0%, i miesza. Całą hodowlę razem z substancją stabilizującą suszy się w suszarce rozpyłowej, stosując temperaturę na wylocie 80—95°C. Otrzymany w ten sposób preparat cynk-bacytracyny do celów paszowych nie zawiera praktycznie żywych komórek szczepu produkcyjnego.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania bacytracyny do celów paszowych nie zawierającej endospor, przy użyciu szczepów z rodzaju *Bacillus*, **znamienny tym**, że proces biosyntezy bacytracyny prowadzi się przy użyciu mutantów fagoopornych i asporogennych, niezdolnych do rewersji, na płynnych pożywkach, zawierających przyswajalne źródła azotu i węgla pochodzenia roślinnego i/lub zwierzęcego oraz sole mineralne i kwasy organiczne, w temperaturze poniżej 40°C, korzystnie w temperaturze 31—35°C, przy równoczesnym mieszaniu i napowietrzaniu, w czasie potrzebnym do wytwarzania bacytracyny w hodowli, do której dodaje się następnie substancji stabilizującej, takiej jak siarczan cynkowy, po czym hodowlę suszy się w suszarce rozpyłowej