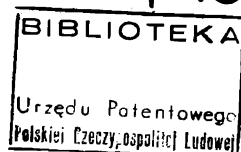


Opublikowano dnia 31 sierpnia 1960 r.

C 12 d 9/16



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 43449

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 Inanostatyny na drodze biosyntezy za pomocą nowego szczepu *Streptomyces species* INA-389.

Inanostatyna podobna jest do znanego antybiotyku erytromycyny, co stwierdzono na podstawie analizy elementarnej, skręcalności właściwej światła spolaryzowanego i wartości R_f w chromatografii bibułowej.

Jak wiadomo, przy wytwarzaniu erytromycyny podczas procesu fermentacji trwającej 72 – 120 godzin w temperaturze 30 – 36°C występuje bardzo silne pienienie, przy czym poza antybiotykiem wytwarza się niezidentyfikowany pigment barwy czerwonej, rozpuszczalny zarówno w podłożu jak i w organicznych rozpuszczalnikach. Pigment ten w dużej mierze utrudnia wydzielanie czystego produktu i znacznie obniża wydajność procesu.

Stwierdzono, że zastosowanie do biosyntezy nowego szczepu *Streptomyces species* INA-389, umożliwia wyeliminowanie pienienia się

brzeczki i wytwarzania się pigmentu, co z kolei pozwala na otrzymanie czystego antybiotyku.

Nowy szczep *Streptomyces species* INA-389 wyizolowano z gleby w Polsce. Wykazuje on następujące właściwości: na stałych pożywkach agarowych posiada silny, gęsty wzrost grzybni powietrznej o barwie białoszarej.

Pod mikroskopem obserwuje się strzępki grzybni z zarodnikami, układającymi się w łańcuchy. Na agarze ziemniaczanym grzybnia bujnie rośnie, jest silna, gęsta i tworzy zarodniki o zabarwieniu szaro-białym. Na pożywce z żelatyną rośnie wokół ścianki probówki i nieznacznie rozrzedza podłoże.

Na bulionie z glukozą rośnie w postaci białego kożucha na jego powierzchni.

Na agarze syntetycznym rośnie słabo i tworzy grzybnię o zabarwieniu szarym.

Na mleku z lakmusem rośnie na powierzchni pożywki, alkalinując jednocześnie podłoże. Szczep *Streptomyces* sp. INA-389 jest bardzo

silnym tlenowcem i posiada optymalną temperaturę wzrostu 38°C.

Badania porównawcze szczepu *Streptomyces species* INA-389 ze szczepem *Streptomyces erythreus* ATCC 11635 – producentem erytromycyny wykazały różnice uwidocznione w poniższej tabeli:

Oprócz tego dodaje się soli mineralnych: NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, KCl, NH_4Cl , KH_2PO_4 w celu utrzymania odpowiedniego pH stosuje się najkorzystniej $CaCO_3$.

Inanostatynę wydziela się z brzeczki fermentacyjnej przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym, a następnie oczyszcza np. przez

	Strept. erythreus ATCC – 11635	Strept. species INA-389
Mikroskopowo	Zarodniki na spiralnych konidiforach.	Zarodniki na konidiforach – różnych długości.
Agar zwykły	Wzrost dość dobry, grzybnia powietrzna biała, później różowa, ciemne zabarwienie podłoża.	Wzrost dość dobry, grzybnia powietrzna biała, później szara.
Agar kartoflany	Wzrost bardzo dobry, grzybnia początkowo biała, później różowa.	Wzrost bardzo dobry, grzybnia początkowo biała, później szara.
Żelatyna	Wzrost na powierzchni rozrzedzonego podłoża.	Słaby wzrost na powierzchni, lekko rozrzedzenie podłoża.
Mleko z lakmusem	Wzrost na powierzchni, peptonizuje i alaklizuje podłoże.	Wzrost na powierzchni, alkalizacja podłoża.
Bulion	Wzrost w postaci kożucha, ciemne zabarwienie podłoża.	Wzrost w postaci delikatnego kożucha, nie barwi bulionu.
Pigment	Wytwarza różowy pigment.	Na podłożu płynnym nie wytwarza rozpuszczalnego pigmentu.
Optymalna temperatura wzrostu	27° – 30°C	38° – 39°C
	Tlenowiec.	Wybitny tlenowiec.

Szczep *Streptomyces species* INA-389 przechowuje się na podłożu ziemniaczano-agarowym, w piasku lub na kaszy jaglanej.

W procesie otrzymywania Inanostatyny stosuje się szczep *Streptomyces species* INA-389 poddawany uprzednio w znany sposób selekcjom za pomocą środków mutagennych promieni UV, iperytu azotowego.

Według wynalazku, proces fermentacji gębinowej prowadzi się w temperaturze poniżej 40°C, najkorzystniej w temperaturze 38 – 39°C w ciągu 72 – 100 godzin. W 80 godzinie fermentacji brzeczka osiąga szczytową aktywność.

Do pożywki fermentacyjnej wprowadza się następujące składniki: jako źródło węgla skrobię, glukozę, sacharozę, wyciąg namokowy ziemniaków itd., jako źródło azotu mąkę z wytlóków arachidowych, orzechy arachidowe, mąkę grochową, wyciąg namokowy kukurydzy.

reekstrakcję do roztworu wodnego i wysolenie.

P r z y k ł a d: Fermentacja dwustadiowa na trzęsawce. Szczep *Streptomyces* sp. INA-389 hodowano na podłożu stałym o następującym składzie:

Wyciąg namokowy z 400 g ziemniaków

Agar 20 g

Woda do 1 litra

Czas trwania inkubacji 4 – 5 dni w temperaturze 38°C.

Stadium I. Zarodnikami uzyskanymi z hodowli szczepu na wymienionym wyżej stałym podłożu zaszczepia się pożywkę posiewową o następującym składzie:

$CaCO_3$ 0,6%

Wyciąg namoku kukurydzy 2,0% (suchej masy)

Sacharoza 3,0%

$(NH_4)_2SO_4$ 0,4%

pH — naturalne. Sterylizację prowadzi się 20 minut w temperaturze 130°C. Inkubacja na trzęsawce trwa 48 godzin w temperaturze 38°C.

Stadium II. Uzyskanym 48-godzinnym wegetatywnym inoculum I stadium w ilości 1% objętościowego szczepi się kolby z pożywką produkcyjną o następującym składzie:

mąka arachidowa	2,0%
wyciąg namoku ziemniaczanego	2,0% (suchej substancji)
wyciąg namoku kukurydzy	0,6% „ „
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1%
NaCl	0,4%
Olej sojowy lub arachidowy	0,5%

Pożywkę sterylizuje się przez 20 minut w temperaturze 130°C, po czym prowadzi się inkubację na trzęsawce przez 82 godziny w temperaturze 38°C. Oznaczenie aktywności brzezki fermentacyjnej dokonuje się znany-
mi metodami biologicznymi i chemicznymi.

Przesącz brzezki z kolb fermentacyjnych w ilości 1,8 l alkalizuje się za pomocą 2 n NaOH do pH = 10 i ekstrahuje 2 krotnie 10% i 5% objętościowymi octanu amyloвого z dodatkiem 0,1% chlorku dwumetylo-laurylobenzyloamoniowego. Połączone fazy organiczne eks-

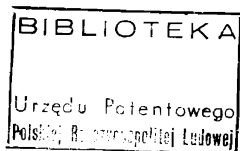
trahuje się dwukrotnie 10% i 5% objętościowymi wody zakwaszonej do pH = 4,5. Połączone wyciągi wodne w ilości około 45 ml o stężeniu 30.000 j/ml zadaje się 12 ml acetonu i w trakcie mieszania dodaje do nich siarczynu amonowego do nasycenia. Mieszaninę alkalizuje się 1 n NaOH do pH = 9 i ogrzewa do temperatury 50°C. Uzyskany wyciąg acetonowy zadaje się równą objętością wody i pozostawia na 48 godzin w temperaturze pokojowej.

Wykrystalizowany antybiotyk sący się pod próżnią, przemywa wodą i suszy. Otrzymany preparat posiada moc 862 mcg/mg.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania nowego antybiotyku Inanostatyny, znamienny tym, że proces biosyntezy prowadzi się metodą fermentacji głębinowej w obecności szczepu *Streptomyces species* INA-389 w temperaturze poniżej 40°C, najkorzystniej w temperaturze 38 — 39°C, na pożywce zawierającej przyswajalny węgiel, azot i sole mineralne do czasu wytworzenia przez ten szczep antybiotyku, który izoluje się przez ekstrakcję rozpuszczalnikiem organicznym, reekstrakcję do roztworu wodnego i wysolenie.
2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że do pożywki produkcyjnej wprowadza się produkty otrzymane z orzechów arachidowych i wyciąg namoku ziemniaczanego.

Instytut Antybiotyków



Wzór jednoraz. Stoł. Zakł. Graf. — WG. Zam. 789, 100 egz., A1 piśm., kl. III.