



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 23.06.75 (P. 181510)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 17.01.77

Opis patentowy opublikowano: 30.09.1978

MKP C12d 9/14

Int. Cl.² C12D 9/14

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Zbigniew Ruczaj, Lidia Paśś, Barbara Ostrowska-
-Krysiak, Małgorzata Gurkau, Barbara Krawczyk
Jadwiga Wolf

Uprawniony z patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego, Warsza-
wa (Polska)

Sposób wytwarzania antybiotyków, zwłaszcza erytromycyny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania antybiotyków, zwłaszcza erytromycyny, przy wykorzystaniu odpadowej grzybni promieniowców jako składnika pożywek do hodowli szczepów.

Znane jest stosowanie jako składników podłoża w hodowli drobnoustrojów komórek drożdży oraz nienaruszonych grzybni promieniowców, które dodawane są jako źródło azotu, węgla i witamin. W opisie patentowym brytyjskim nr 1 139 589 podany jest sposób otrzymywania moenomycyny na podłożu fermentacyjnym zawierającym odpadowe grzybnie promieniowców, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus* i drożdży.

W metodzie według opisu patentowego czeskiego nr 142797 odpadowe grzybnie *Penicillium* i *Streptomyces aureofaciens* stosuje się w podłożach do hodowli szczepów, wytwarzających L-lizynę. Inne opisy patentowe czeskie nr 131616 i nr 131617 podają sposób otrzymywania L-lizyny z hodowli drobnoustrojów, rozwijających się na podłożu z dodatkiem mąki arachidowej poddanej działaniu proteaz, zawartych w nienaruszonej grzybni *Penicillium*.

W opisie patentowym polskim nr 64127 podany jest sposób wytwarzania nowych pożywek, zawierających drożdże, stanowiące produkt uboczny przy mikrobiologicznym odparafinowaniu frakcji ropy naftowej.

W opisanych dotychczas metodach jako dodatek do podłoża stosuje się nienaruszone komórki drob-

2

noustrojów, nie poddawane żadnej obróbce wstępnej, co utrudnia ich pełne wykorzystanie.

Sposób według wynalazku eliminuje powyższe wady i różni się od uprzednio opisanych tym, że z grzybni promieniowców uwalniane są zawarte w komórkach enzymy hydrolityczne, a w szczególności proteolityczne i amylolityczne, które działając na białka i węglowodany zawarte w tej grzybni, powodują ich hydrolizę do łatwo przyswajalnych przez drobnoustroje peptydów oraz/lub wolnych aminokwasów i cukrów prostych.

Według wynalazku zawiesinę wodną odpadowej grzybni promieniowców, w szczególności grzybni szczepu *Streptomyces erythreus*, otrzymanej np. z biosyntezy erytromycyny, poddaje się rozbiciu komórek, korzystnie za pomocą dezintegratora ultradźwięków oraz/lub homogenizatora, otrzymany homogenat inkubuje się w temperaturze 20–50°C korzystnie w temperaturze 30–35°C, przy wartości pH = 7–11, korzystnie przy wartości pH około 10, a otrzymany płynny autolizat ewentualnie pozbawia się reszty antybiotyku i ewentualnie suszy; lub z otrzymanego homogenatu po ewentualnym oddzieleniu części stałych wysala się enzymy, surowy preparat enzymatyczny wyodrębnia się i ewentualnie suszy, dodaje się do zawiesiny wodnej mąki sojowej, rzepakowej lub innej, mieszaninę inkubuje się w podanych wyżej warunkach temperatury i wartości pH, a otrzymaną trawioną mąkę pozbawia się reszty antybiotyku oraz/lub suszy; albo też

homogenat bezpośrednio dodaje się do mąki, mieszaninę inkubuje się w podanych wyżej warunkach temperatury i wartości pH, a otrzymaną trawioną mąkę pozbawia się reszty antybiotyku oraz/lub suszy; po czym otrzymany w ten sposób autolizat lub trawioną mąkę dodaje się do podłoża do hodowli drobnoustrojów, zastępując w części lub całkowicie mąkę sojową, rzepakową lub inną mąkę, stosowaną zwykle jako składnik pożywek oraz prowadzi się proces biosyntezy w warunkach konwencjonalnych.

Przed zhomogenizowaniem odpadową grzybnię zawiesza się w wodzie w stosunku wagowym 1—5 części wody na 1 część wilgotnej grzybni.

Wysolenie enzymów z homogenatu ewentualnie pozbawionego części stałych prowadzi się korzystnie przez dodawanie stałego siarczanu amonowego do stężenia około 60%.

Do 1—20% zawiesiny mąki w wodzie, korzystnie około 10% zawiesiny mąki w wodzie, dodaje się surowy preparat enzymatyczny w ilości 10—1000 j proteazy, korzystnie 100—500 j proteazy, na 1 ml zawiesiny. Mąkę dodaje się do homogenatu w takiej ilości, aby otrzymać 1—20% zawiesinę, korzystnie około 10% zawiesinę mąki w homogenacie.

Stosując według wynalazku w/w preparaty w podłożach do hodowli szczepu wytwarzającego erytromycynę, uzyskuje się zwiększenie wydajności antybiotyku o około 20% w stosunku do wydajności, uzyskiwanych w hodowli na standardowym podłożu opisanym w opisie patentowym nr 59792.

Grzybnia promieniowców jest bogatym źródłem węgla, azotu, substancji wzrostowych i enzymów. Wśród enzymów znaczną ilość stanowią enzymy hydrolityczne, a w szczególności enzymy o aktywności proteolitycznej czyli proteazy. Dla przykładu podano w tablicy 1 aktywność proteaz i amylaz w grzybni rozbitej przy użyciu dezintegratora ultradźwięków firmy MSE 100 W lub laboratoryjnego homogenizatora mechanicznego firmy Eppenbach Inc. Long Island, N.Y. USA.

Tablica 1

Rodzaj grzybni	Proteazy w j/ml		α-amylazy w mg maltozy (10' ml)	
	homo-genizator	ultra-dźwięki	homo-genizator	ultra-dźwięki
<i>S. erythreus</i>	725	740	3,0	3,4
<i>S. linconensis</i>	82	88	1,4	1,2
<i>S. vinaceus</i>	50	52	0	0
<i>S. griseus</i>	85	45	0	0

Optimum działania enzymów proteolitycznych *S. erythreus* z grzybni znajduje się przy wartości pH około 10 i jest identyczne z optimum wartości pH proteazy *S. erythreus*, wydzielanej do podłoża. Proteazy te wykazują również znaczną stabilność w temperaturach do 50°C w czasie ich izolowania (Acta Microbiol. Pol., Ser. B. 1973, 5, 21—27), co umożliwia ich praktyczne wykorzystanie. W przy-

gotowaniu homogenatów grzybni promieniowców sposobem według wynalazku szczególnie przydatna jest grzybnia szczepu *S. erythreus*, wytwarzającego erytromycynę, z uwagi na dużą aktywność zawartych w nich proteaz. Enzymy proteolityczne hydrolizują zawarte w grzybni białka do peptydów i wolnych aminokwasów. Tak uzyskany autolizat stosuje się jako składnik pożywki, zastępujący inne substancje białkowe (jak np. mąkę sojową) w hodowli szczepów wytwarzających antybiotyki. Autolizat dodaje się w postaci płynnej zawiesiny, bądź po wysuszeniu w postaci sproszkowanej. W tym celu grzybnię odpadową zawiesza się w takiej ilości wody, aby uzyskać płynną masę, korzystnie w stosunku 100 g grzybni w 200 ml wody, po czym pH doprowadza się do wartości 7—11, korzystnie około 10, przy użyciu np. roztworu wodorotlenku sodowego.

Zawiesinę grzybni poddaje się rozbiciu ultradźwiękami bądź w homogenizatorze mechanicznym do uwolnienia zawartych w grzybni białek, aminokwasów i enzymów hydrolitycznych. Rozbicie dużych ilości grzybni w skali technicznej można przeprowadzić przy użyciu homogenizatora mechanicznego pracującego w sposób ciągły, np. za pomocą homogenizatora Dyno-Mühle KD5 firmy Willy A. Bachofen, Bazylea, Szwajcaria, lub ciśnieniowego, np. za pomocą homogenizatora firmy Manton-Gaulin 15 M 8TBA.

Zhomogenizowaną zawiesinę rozbitej grzybni pozostawia się w temperaturze 20—50°C, korzystnie w temperaturze 30—35°C, przy umiarkowanym mieszaniu na okres 3—20 godzin w celu przeprowadzenia enzymatycznej hydrolizy zawartych w homogenacie białek do związków prostszych.

W tablicy 2 przedstawiono przyrost stężenia aminokwasów w czasie autolizy rozbitych grzybni różnych szczepów promieniowców.

Tablica 2

Szczep	Aminokwasy w mg/ml	
	grzybnia przed autolizą	grzybnia po autolizie
<i>S. erythreus</i>	3,04	6,70
	3,00	29,2
<i>S. linconensis</i>	2,35	2,65
<i>S. vinaceus</i>	0,17	2,46
<i>S. griseus</i>	5,00	5,70

Autolizat grzybni po inkubacji może być przechowywany w postaci płynnej z dodatkiem środka konserwującego, bądź też może być wysuszony w suszarce rozpyłowej.

Autolizaty stosuje się do przygotowania podłoży do hodowli szczepów wytwarzających antybiotyki, zastępując nimi częściowo lub całkowicie takie składniki, jak mąka sojowa, mąka arachidowa i inne. Homogenaty przygotowane z grzybni sączonych z użyciem ziemi okrzemkowej są w pełni przydatne jako dodatki do podłoży.

Enzymy proteolityczne zawarte w rozbitej grzybni w postaci homogenatu stosuje się również do

trawienia innych białek, np. zawartych w mące sojowej, mące arachidowej, mące rzepakowej, mące grochowej i innych. W różnego rodzaju mąkach poddanych trawieniu, wskutek działania enzymów proteolitycznych uwalniają się peptydy i wolne aminokwasy, jak również wskutek działania enzymów amylolitycznych wzrasta ilość wolnych cukrów, zwiększając w ten sposób przyswajalność podłoża przez różne drobnoustroje. Wśród wolnych aminokwasów uwalniających się z mąki pod wpływem enzymów proteolitycznych stwierdzono występowanie znacznej ilości metioniny. Aminokwas

ten odgrywa dużą rolę zarówno przy biosyntezie erytromycyny, gdzie dostarcza grup metylowych w reakcji przekształcania erytromycyny C do erytromycyny A, jak również w biosyntezie L-lizyny, gdzie odgrywa dużą rolę regulatora procesu.

W tablicy 3 przedstawiono przyrost wolnych aminokwasów, w szczególności metioniny, oraz prostych cukrów, uwalniających się pod wpływem działania enzymów proteolitycznych i amylolitycznych, zawartych w homogenacie rozbitej grzybni *Streptomyces erythreus*, na poszczególne rodzaje mąk trawionych.

Tablica 3

Rodzaj mąki	Aminokwasy w mg/ml		Metionina w mg/ml		Cukry w mg/ml	
	mąka nie-trawiona	mąka po autolizie	mąka nie-trawiona	mąka po autolizie	mąka nie-trawiona	mąka po autolizie
Mąka sojowa	0,88	21,0	2	150	4,4	8,6
Mąka rzepakowa	0,60	24,0	—	—	2,9	9,6
Mąka owsiana	0,0	9,1	—	—	2,3	7,9
Mąka arachidowa	0,59	19,8	46	92	2,3	5,6
Mąka grochowa	0,94	16,0	—	—	5,5	9,6

Do proteolizy mąki mogą być użyte proteazy, zawarte w różnych gatunkach promieniowców, jak również proteazy z *Bacillus subtilis*, które znajdują się w handlu pod różnymi nazwami, jak np. maksatasa, subtilizyna. Jednakże najlepsze wyniki proteolizy uzyskuje się stosując rozbitą grzybnię *S. erythreus*, co ilustrują wyniki przedstawione w tablicy 4.

Tablica 4

Preparat enzymatyczny	Aminokwasy ogółem w mg/ml	
	mąka nie-trawiona	mąka po proteolizie
Homogenat grzybni <i>S. erythreus</i>	0,88	21,00
Homogenat grzybni <i>S. linkolnensis</i>	0,88	12,50
Homogenat grzybni <i>S. vinaceus</i>	0,88	8,92
Homogenat grzybni <i>S. griseus</i>	0,88	7,30
Proteaza izolowana z <i>B. subtilis</i> 1000 j/ml	0,88	6,85

Hydrolizę mąki przy użyciu enzymów proteolitycznych, zawartych w rozbitej grzybni, przeprowadza się w ten sposób, że sporządza się 10% zawiesinę odpowiedniej mąki w świeżo przygotowanym homogenacie z grzybni promieniowca, np. *S. erythreus*, dodaje się środka konserwującego, np. toluen w ilości 0,1–0,5%, i inkubuje w temperaturze 32°C w ciągu 3–20 godzin mieszając.

Ponieważ homogenat rozbitej grzybni zawiera antybiotyk pozostały w grzybni, po dodaniu do pod-

łoża może on hamować rozwój drobnoustroju, gdy hodowlę prowadzi się z użyciem szczepu wrażliwego na dany antybiotyk. W tym przypadku antybiotyk, zawarty w autolizacie, neutralizuje się znanymi metodami, np. erytromycynę rozkłada się przez hydrolizę kwaśną, dodając do mieszaniny po zakończeniu inkubacji kwas solny do stężenia 1N i ogrzewając w temperaturze wrzenia w ciągu 1 godziny pod chłodnicą zwrotną, a następnie mieszaninę oziębia i neutralizuje np. wodorotlenkiem sodowym, potasowym lub amonowym.

Obecność antybiotyku w autolizacie może nie wywierać efektu hamującego, gdy w hodowli stosuje się szczep niewrażliwy na działanie określonego antybiotyku, bądź może być korzystna z uwagi na ochronne działanie antybiotyku, zapobiegające zakażeniu obcymi drobnoustrojami. W przypadku hodowli szczepu *S. erythreus* na podłożu, zawierającym autolizat, obecność antybiotyku nie przeszkadza w rozwoju drobnoustroju wytwarzającego erytromycynę.

W podobny sposób przeprowadza się hydrolizę mąki przy użyciu surowego preparatu enzymatycznego, wydzielonego z homogenatu grzybni. Preparat ten otrzymuje się w ten sposób, że odmytą grzybnię promieniowca np. *S. erythreus*, rozbija się według metody, stosowanej do sporządzenia homogenatu. Otrzymany homogenat odwirowuje się przy sile wirowania 23 000 $\times$ g i części stałe odrzuca. Do roztworu po odwirowaniu dodaje się techniczny siarczan amonowy do stężenia 60%, pozostawia na kilka godzin i wydzielony osad odwirowuje. Osad ten wysuszony w suszarce próżniowej w temperaturze 40–50°C lub w suszarce rozpyłowej stanowi surowy preparat enzymatyczny. W celu przeprowadzenia hydrolizy enzymatycznej sporządza się 1 do 20%, korzystnie około 10%, zawiesiny mąki w wodzie i dodaje się preparat enzymatyczny w takiej ilości, aby uzyskać aktywność

proteazową od 10 do 1000 j/ml, korzystnie 100 do 500 j/ml. Następnie mieszaninę inkubuje się w temperaturze 30–40°C w sposób podany powyżej. Za jednostkę przyjęto tę ilość enzymu, która powoduje zmianę ekstynkcji równą 0,01 w określonych warunkach reakcji (enzym inkubowany z 2% roztworu kazeiny przy wartości pH = 11, w temperaturze 40°C w ciągu 40 minut, odczyt ekstynkcji przy 280nm).

W tablicy 5 przedstawione są wyniki hydrolizy mąki sojowej przy użyciu surowego preparatu enzymatycznego *S. erythreus* w zależności od czasu inkubacji.

Tablica 5

Preparat enzymatyczny	Stężenie proteazy w j/ml	Zawartość aminokwasów w mg/ml przy czasie inkubacji godziny	
		3 godziny	20 godzin
Homogenat grzybni <i>S. erythreus</i> roztwór surowego preparatu enzymatycznego z grzybni <i>S. erythreus</i>	400	18,0	29,3
	8,3	1,0	0,94
	33,0	3,84	2,24
	66,0	5,88	5,00

Wyniki, przedstawione w tablicy 5, wskazują na możliwość skrócenia czasu inkubacji w przypadku trawienia mąki surowym preparatem enzymatycznym.

Sposób według wynalazku wyjaśniają następujące przykłady:

Przykład I. Przygotowanie autolizatu grzybni *S. erythreus* oraz zawiesiny trawionej mąki sojowej.

Do 250 g odpadowej grzybni pofermentacyjnej *S. erythreus* dodano 500 ml wody, doprowadzono pH do wartości 10,5 przy użyciu 1 N NaOH i zawiesinę homogenizowano w homogenizatorze laboratoryjnym w ciągu 20 minut. Efektywność rozbięcia obserwowano w mikroskopie, przy czym powinny być widoczne ziarnistości z rozbitej grzybni. Homogenat grzybni zawierał 465 j proteazy/ml. Homogenat stosowano do przygotowania autolizatu z grzybni, to jest preparatu, zawierającego głównie peptydy i aminokwasy, uwolnione z białek grzybni, oraz do przygotowania trawionej mąki sojowej, to jest preparatu, zawierającego głównie peptydy i aminokwasy, uwolnione zarówno z białek grzybni, jak i z białek mąki.

a. Przygotowanie autolizatu grzybni

Homogenat rozlano w ilości 200 ml do kolb Erlenmayera o pojemności 500 ml i inkubowano w temperaturze 32°C w ciągu 20 godzin lekko mieszając. Ilość aminokwasów wzrasta w czasie inkubacji z 3,04 mg/ml do 6,70 mg/ml, a ilość wolnej metioniny z 21 mcg/ml do 64 mcg/ml. Autolizat

poddano wysuszeniu w suszarce rozpyłowej, lub pozostawiono w postaci zawiesiny płynnej.

b. Przygotowanie trawionej mąki sojowej

Sporządzono zawiesinę mąki sojowej w homogenacie w ilości 5 g mąki w 100 ml homogenatu oraz inkubowano ją w warunkach podanych w pkt. a. Po inkubacji ilość aminokwasów wzrasta z 3,92 mg/ml do 21 mg/ml, a ilość metioniny z 94 mcg/ml do 150 mcg/ml. Zawiesinę trawionej mąki sojowej poddano ewentualnie wysuszeniu w suszarce rozpyłowej.

Przykład II. Przygotowanie preparatu trawionej mąki sojowej przy użyciu homogenatu grzybni *S. erythreus*

Homogenat z grzybni *S. erythreus*, uzyskany według przykładu I, zawierający 337 j proteazy/ml, stosowano do przygotowania preparatu trawionej mąki sojowej. Zawiesinę mąki w homogenacie w proporcji 10 g mąki na 100 ml homogenatu inkubowano, jak w przykładzie I. W celu usunięcia antybiotyku, pozostałego w grzybni *S. erythreus*, do zawiesiny do inkubacji dodano 4 N HCl w ilości 10% objętościowych w stosunku do homogenatu i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w ciągu 1 godziny. Oziębioną zawiesinę zobojętniono przy pomocy stałego NaOH, a następnie wysuszono w suszarce rozpyłowej. Z 1 g mąki sojowej uzyskano 1,2 g preparatu trawionego. Porównanie ilości aminokwasów w preparacie trawionym i nietrawionym podano w tablicy 6.

Tablica 6

Preparat	Aminokwasy ogółem w mg/g	W tym metionina w mg/g
Mąka sojowa nietrawiona	8,0	0,08
Mąka sojowa trawiona	91,5	1,47

Przykład III. Przygotowanie preparatu trawionej mąki rzepakowej przy użyciu homogenatu grzybni *S. erythreus*

Homogenat z grzybni *S. erythreus*, uzyskany sposobem, opisanym w przykładzie I, zawierający 548 j proteazy/ml stosowano do przygotowania preparatu trawionej mąki rzepakowej. Zawiesinę 10% mąki w homogenacie inkubowano w ciągu 20 godzin w warunkach, opisanych w przykładzie I. Antybiotyk pozostały w grzybni usunięto sposobem, opisanym w przykładzie II. Preparat wysuszono w suszarce rozpyłowej. Z 1 g mąki rzepakowej uzyskano 1,2 g preparatu trawionego. Porównanie ilości aminokwasów w preparacie trawionym i nietrawionym podano w tablicy 7.

Tablica 7

Preparat	Aminokwasy ogółem w mg/g	W tym metionina w mg/g
Mąka rzepakowa nietrawiona	10,6	0,81
Mąka rzepakowa trawiona	72,0	1,10

Przykład IV. Otrzymywanie surowego preparatu enzymatycznego z homogenatu *S. erythreus*

Homogenat grzybni *S. erythreus*, uzyskany sposobem według przykładu I, wirowano przy sile wirowania $23000 \times g$ w ciągu 30 minut, części stałe odrzucono, a z supernatantu wysolono enzymy przez wysycenie siarczanem amonowym do stężenia 60%. Wytrącony surowy enzym odwirowano po 18 godzinach przy $23000 \times g$ w ciągu 30 minut i wysuszono w suszarce w temperaturze około 50°C. Preparat zawiera 28000 j proteaz w 1 g.

Przykład V. Przygotowanie preparatu trawionej mąki sojowej przy użyciu surowego preparatu enzymatycznego z grzybni *S. erythreus*.

Preparat enzymatyczny, otrzymany sposobem według przykładu IV, stosowano do otrzymania preparatu trawionej mąki sojowej, dodając go w ilości 100 j proteazy na 1 ml 10% zawiesiny mąki sojowej w wodzie, oraz doprowadzając pH do wartości 10,5 przy użyciu 1N NaOH. Zawiesinę inkubowano w ciągu 3 godzin w warunkach, podanych w przykładzie I, a następnie wysuszono w suszarce rozpyłowej.

Porównanie ilości aminokwasów w preparacie mąki trawionej i nierawionej podano w tablicy 8

Tablica 8

Preparat	Aminokwasy ogółem w mg/g
Mąka sojowa	8,0
Mąka sojowa trawiona	58,8

Przykład VI. Przyrost suchej masy *S. erythreus* i biosynteza antybiotyku na podłożu rozpuszczalnym z dodatkiem autolizatu z grzybni *S. erythreus*.

Do rozpuszczalnego płynnego podłoża, zawierającego ekstrakt z mąki sojowej, o składzie: 3% wyciągu z mąki sojowej; 5% glukozy; 0,3% $(NH_4)_2SO_4$; 0,5% NaCl, 0,6% $CaCO_3$; 1% propanolu, i wody wodociągowej do 100% dodano w postaci płynnej autolizatu, otrzymany według przykładu I w ilościach 7,5%, 15% lub 30% w stosunku do objętości pożywki, a następnie zaszczepiono podłoże hodowlą *S. erythreus*. W 120 godzinie hodowli zaobserwowano zwiększenie suchej masy grzybni i zwiększenie biosyntezy antybiotyku w porównaniu z podłożem kontrolnym nie zawierającym autolizatu, co wynika z tablicy 9.

Tablica 9

Po 120 godzinach hodowli	Przyrost suchej masy grzybni w mg/ml	Stężenie ery- tromycyny w brzeczce fermentacyjnej
bez dodatku autolizatu po dodaniu autolizatu w ilości:	—	1540 j/ml
7,5%	9,93	2040 j/ml
15%	11,73	2180 j/ml
30%	12,94	2560 j/ml

Przykład VII. Zastosowanie preparatów enzymatycznych grzybni *S. erythreus* w podłożu do biosyntezy erytromycyny.

W standardowej płynnej pożywce dla produkcji erytromycyny, opisanej w opisie patentowym nr 59792 o składzie: 3% mąki sojowej, 2% skrobi, 4% glukozy, 0,5% NaCl, 0,6% $CaCO_3$, 0,9% alkoholu n-propylowego i wody wodociągowej do 100%:

- a) zastąpiono 25% mąki sojowej wysuszonym autolizatem grzybni *E. erythreus*, przygotowanym według przykładu I,
- b) zastąpiono całkowicie mąkę sojową suszonym preparatem trawionej mąki sojowej przygotowanej według przykładu I;
- c) uzupełniono standardową pożywkę płynnym autolizatem grzybni, uzyskanym według przykładu I, dodając go w ilości 20% w stosunku objętościowym do ilości pożywki na początku i w 48 h hodowli.

We wszystkich wymienionych przypadkach tak wzbogacone podłoże zaszczepiono je hodowlą *S. erythreus*, oznaczając w brzeczce zawartość erytromycyny po 144 godzinach fermentacji. Wyniki porównano z fermentacją prowadzoną na podłożu, nie zawierającym w/w preparatów w tym samym czasie.

Wyniki przedstawiono w tablicy 10:

Tablica 10

Wprowadzona zmiana podłoża	Wydajność biosyntezy erytromycyny w mcg/ml brzeczki	
	podłoże kontrolne	podłoże wzbogacone
a) Zastąpienie 25% mąki sojowej wysu- szonym autoliza- tem grzybni <i>S. erythreus</i>	3730	4050
b) Zastąpienie całko- wite mąki sojowej preparatem mąki trawionej z grzybni <i>S. erythreus</i>	3600	4400
c) Uzupełnienie podło- ża płynnym autoli- zatem grzybni <i>S. erythreus</i> w 0 h fermentacji	2640	3730
w 48 h fermentacji	3800	4360

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania antybiotyków, zwłaszcza erytromycyny, przez wykorzystanie odpadowej grzybni promieniowców do hodowli drobnoustrojów i fermentację w warunkach konwencjonalnych, znamienny tym, że jako składnik pożywki stosuje się produkt, otrzymany z zawiesiny wodnej odpadowej grzybni promieniowców, w szczególności grzybni *Streptomyces erythreus* z biosyntezy ery-

tromycyny, w stosunku wagowym 1—5 części wody na 1 część grzybni, przez rozbicie komórek, korzystnie za pomocą dezintegratora ultradźwięków oraz/lub homogenizatora, inkubację otrzymanego homogenatu w temperaturze 20—50°C, korzystnie w temperaturze 30—35°C, przy wartości pH = 7—11, korzystnie przy wartości pH około 10, i następne pozbowienie otrzymanego autolizatu reszty antybiotyku oraz/lub suszenie, który to produkt dodaje się do podłoża do hodowli drobnoustrojów, zastępując w części lub całkowicie mąkę sojową, rzepakową lub inną, stosowaną zwykle jako składnik pożywek w stosunku wagowym 5—100% w przeliczeniu na suchą masę.

2. Sposób wytwarzania antybiotyków, zwłaszcza erytromycyny, przez wykorzystanie odpadowej grzybni promieniowców do hodowli drobnoustrojów i fermentacji w warunkach konwencjonalnych, **znamienny tym**, że jako składnik pożywki stosuje się produkt, otrzymany z zawiesiny wodnej odpadowej grzybni promieniowców, w szczególności grzybni *Streptomyces erythreus* z biosyntezy erytromycyny, w stosunku wagowym 1—5 części wody na 1 część grzybni, przez rozbicie komórek, korzystnie za pomocą dezintegratora ultradźwięków oraz/lub homogenizatora, oddzielenie z otrzymanego homogenizatu części stałych, wysolenie enzymów i wyodrębnienie surowego preparatu enzymatycznego, ewentualne wysuszenie go, dodanie do zawiesiny wodnej mąki sojowej, rzepakowej lub innej stosowanej zwykle jako składnik pożywki, inkubację mieszaniny w temperaturze 20—50°C, korzystnie w temperaturze 30—35°C, przy wartości pH 7—11, korzystnie przy wartości pH około 10, następne pozbowienie otrzymanej trawionej mąki reszty antybiotyku oraz/lub suszenie, który to produkt dodaje się do podłoża do hodowli drobnoustrojów, zastępując w części lub całkowicie

mąkę sojową, rzepakową lub inną w stosunku wagowym 5—100% w przeliczeniu na suchą masę.

3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że wysolenie enzymów prowadzi się korzystnie przez dodawanie stałego siarczanu amonowego do stężenia około 60%.

4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że stosuje się preparat enzymatyczny w ilości 10—1000 j proteazy, korzystnie 100—500 j proteazy, na 1 ml 1—20% zawiesiny mąki w wodzie, korzystnie około 10% zawiesiny mąki w wodzie.

5. Sposób wytwarzania antybiotyków, zwłaszcza erytromycyny, przez wykorzystanie odpadowej grzybni promieniowców do hodowli drobnoustrojów i fermentację w warunkach konwencjonalnych, **znamienny tym**, że jako składnik pożywki stosuje się produkt, otrzymany z zawiesiny wodnej odpadowej grzybni promieniowców, w szczególności grzybni *Streptomyces erythreus* z biosyntezy erytromycyny, w stosunku wagowym 1—5 części wody na 1 część grzybni, przez rozbicie komórek, korzystnie za pomocą dezintegratora ultradźwięków oraz/lub homogenizatora, dodanie otrzymanego homogenatu do mąki sojowej, rzepakowej lub innej, stosowanej zwykle jako składnik pożywki, inkubację mieszaniny w temperaturze 20—50°C, korzystnie w temperaturze 30—35°C, przy wartości pH = 7—11, korzystnie przy wartości pH około 10, następne pozbowienie otrzymanej trawionej mąki reszty antybiotyku oraz/lub suszenie, który to produkt dodaje się do podłoża do hodowli drobnoustrojów, zastępując w części lub całkowicie mąkę sojową, rzepakową lub inną w stosunku wagowym 5—100% w przeliczeniu na suchą masę.

6. Sposób według zastrz. 5, **znamienny tym**, że stosuje się 1—20% zawiesinę mąki w homogenacie, korzystnie około 10% zawiesinę mąki w homogenacie.