

2

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

69897

Patent dodatkowy
do patentu _____

Kl. 30h,6

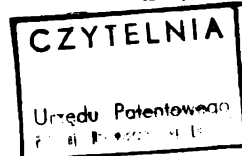
Zgłoszono: 05.IV.1968 (P 126 255)

Pierwszeństwo: 07.IV.1967 (Japonia)

Zgłoszenie ogłoszono: 30.11.1972

Opis patentowy opublikowano: 28.II.1974

MKP C12d 9/14



Twórcy wynalazku: Hamao Umezawa, Tomio Takeuchi, Yoshiro Okami,
Masa Hamada, Kenji Maeda

Uprawniony z patentu: Zaidan Hojin Biseibutsu Kagaku Kenkyu Kai,
Tokio (Japonia)

Sposób wytwarzania antybiotyku kasugamycyny

1 Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania antybiotyku o wzorze podanym na rysunku, zwanego kasugamycyną.

Kasugamycyna jest antybiotykiem, działającym hamująco na rozwój takich mikroorganizmów, jak Pseudomonas, Salmonella, Shigella, Brucella i niektórych Klebsiella, a przy tym jest nietoksyczna. Przeprowadzone badania wykazały, że kasugamycyna nadaje się do leczenia schorzeń, wywołanych zakażeniami przez Pseudomonas i inne mikroorganizmy, a poza tym jest skuteczna w hamowaniu rozwoju mikroorganizmu Pivicularia oryzae, będącego jednym z najpoważniejszych szkodników w uprawach ryżu.

Właściwości fizykochemiczne i biochemiczne kasugamycyny są podane szczegółowo w opisie patentowym nr 60212. Z opisu tego znany jest również sposób wytwarzania kasugamycyny, polegający na tym, że szczep Streptomyces kasugaensis poddaje się w warunkach aerobowych hodowli w wodnym środowisku, zawierającym węglowodany i związki azotowe.

Stwierdzono, że kasugamycynę, można również wytwarzać łatwo i z wysoką wydajnością na drodze hodowli innego, nowego szczepu Streptomyces, nazwanego Streptomyces kasugaspinus, różniącego się wyraźnie od szczepu Streptomyces kasugaensis i jego mutantów. Ten nowy, niżej opisany szczep zalicza się do gatunku Actinomycetes. Jak wiadomo, Actinomycetes łatwo ulegają mu-

2 tacji samorzutnej lub wywoływanej sztucznie, ale specjalna budowa powierzchni zarodników, na przykład kolczasta lub urzęsiona, jest trudna do zmiany. Z tego też względu budowa powierzchni zarodnika jest stosowana jako kryterium do różnicowania gatunków Streptomyces. Na tej też podstawie ustalono, że mikroorganizm, wytwarzający kasugamycynę sposobem według wynalazku, mający budowę zarodników urzęsioną, różni się od S. Kasugaensis, którego zarodniki mają powierzchnię gładką, a także od innych gatunków streptomyces. Ten nowy mikroorganizm, nazwany Streptomyces kasugaspinus wyodrębniono z próbki gleby, pobranej w Maruyama, Usada-cho, w okręgu Nagano, Japonia, w czerwcu 1965 r., stosując pożywkę z agaru z gliceryną i kazeiną.

Wykazuje on następujące cechy charakterystyczne: rozgałęzia się bardzo dobrze na podłożu i rozwija grzybnię powietrzną bez zwojów, lecz mającą spirale różnego typu, jak otwarte, pierwotne i zamknięte. Pod mikroskopem elektronowym zaobserwowano urzęsioną strukturę powierzchni zarodnika. Cechy charakterystyczne hodowli na różnych podłożach podano poniżej.

Na agarze z gliceryną według Czapka w cieplarni w temperaturze 27°C: Wzrost bezbarwny do lekkożółtawego. Obfita grzybnia powietrzna koloru białego do jasnobrunatnawo-szarego. (Według Color Harmony Manual, dalej oznaczonego w

3

skrótach CHM, kolor srebrzysto-szary 3 fe). Barwnik rozpuszczalny nieobecny lub lekkożółtawy.

Na agarze z glikozą i asparaginą według Kraińskiego w cieplarni w temperaturze 27°C: Wzrost bezbarwny. Obfita grzybnia powietrzna koloru białego do jasnoszarego, zmieniającego się do jasnobrunatnawo-szarego (według CHM kolor ciemnoszary 5 ih). Brak barwnika rozpuszczalnego.

Na agarze z jabłczanem wapnia w cieplarni w temperaturze 27°C: Wzrost bezbarwny do koloru bladeżółtawego lub bladopomarańczowego. Barwnik rozpuszczalny nieobecny lub żółtawo-pomarańczowy. Jabłczan wapnia rozpuszczony wokół wzrostu nieregularnie.

W roztworze peptonu, zawierającym 1% NaNO_3 , w cieplarni w temperaturze 27°C: Wzrost bezbarwny z białą grzybnią powietrzną. Barwnik rozpuszczalny nieobecny lub lekkożółtawy. Silna redukcja azotanów.

Na klinie z ziemniaka w cieplarni w temperaturze 27°C: Wzrost bezbarwny do bladeżółtawego. Grzybnia powietrzna koloru białego do jasnoniebieskawo-szarego lub jasnoszarego (według CHM kolor popielaty 5 fe). Barwnik rozpuszczalny nieobecny.

Na płycie agaru ze skrobią w cieplarni w temperaturze 27°C: Wzrost bezbarwny z obfita grzybnia powietrzna koloru białego do jasnoszarego lub jasnobrunatnawo-szarego. Barwnik rozpuszczalny nieobecny lub lekkożółtawy. Hydroliza skrobi słaba lub nie zachodzi wcale. Na pożywce agarowej w cieplarni w temperaturze 37°C: Wzrost dobry bezbarwny do bladeżółtawo-brunatnego. Cienka biała grzybnia powietrzna. Barwnik rozpuszczalny nieobecny.

Na pożywce agarowej w cieplarni w temperaturze 27°C: Wzrost bezbarwny do żółtawo-brunatnego z białą grzybnią powietrzną. Barwnik rozpuszczalny nieobecny.

Na agarze z krwią (10% krwi ludzkiej) w cieplarni w temperaturze 37°C: Wzrost bezbarwny bez grzybni powietrznej. Brak barwnika rozpuszczalnego. Silna hamoliza.

Na surowicy ściętej według Löfflera w cieplarni w temperaturze 37°C: Wzrost bezbarwny, pomarszczony. Brak grzybni powietrznej i barwnika rozpuszczalnego. Surowica ścięta nie przechodzi w stan płynny.

Na podłożu żelatynowym w cieplarni w temperaturze 20°C: Wzrost bezbarwny do żółtawego. Skąpa biała grzybnia powietrzna. Brak barwnika rozpuszczalnego. Silne ścinanie żelatyny.

Na podłożu z odtłuszczonym mlekiem w cieplarni w temperaturze 37°C: Wzrost bezbarwny do bladeżółtawego lub bladobrunatnawego. Brak grzybni powietrznej i barwnika rozpuszczalnego. W środowisku zachodzi silna koagulacja i peptyzacja.

Na agarze z tyrozyną w cieplarni w temperaturze 27°C: Wzrost bezbarwny z grzybnią powietrzną koloru białego do jasnooliwkowo-szarego lub jasnobrunatnawo-szarego. Barwnik rozpuszczalny nieobecny i nie zachodzi reakcja tyrozynowa.

Na podłożu celulozowym (bibuła filtracyjna) w cieplarni w temperaturze 27°C: Lekki wzrost, ale

4

bez rozkładu papieru. Przyswajanie węglowodanów na podłożu podstawowym według Pridham—Gottlieba, w cieplarni w temperaturze 27°C. Dobry wzrost daje mannoza, inozytol, skrobia, laktoza, gliceryna, galaktoza, glikoza, fruktoza i maltoza. Brak wzrostu w obecności ramnozy, inuliny, dulcytu i arabinozy. Ksyloza prawdopodobnie nie jest przyswajana. D — mannit, sorbit, salicyna, rafinoza i sacharoza dają różnorodne wyniki.

Podsumowując podane wyżej cechy charakterystyczne stwierdzono, że nowy szczep należy do rodzaju *Streptomyces* i jest typu niechromogenicznego. Ma on budowę spiralną, lecz nie tworzy zwojów. Powierzchnia zarodnika jest urzęsiona. Na różnych podłożach wykazuje wzrost bezbarwny do żółtawego z grzybnią powietrzną koloru białego do brunatnawoszarego. Barwnik rozpuszczalny nieobecny lub lekkożółtawy. Hydroliza skrobi słaba lub nie zachodzi wcale. Silny rozkład białek w środowisku. Silna redukcja azotanów. Spośród znanych rodzajów *Streptomyces* szczep ten podobny jest do *Streptomyces albus*, odkrytego przez S. A. Waksmana w *The Actinomycetes* tom 2, strona 172. Ze względu na urzęsioną strukturę powierzchni zarodnika szczep ten można łatwo odróżnić od *S. albus*, mającego gładką powierzchnię zarodnika. [E. Baldacci i inni, *Giornale di Microbiologia* I, 28 (1955), W. Flaig i inni *Zent. Bakt.* II Abt., 108, 376 (1955)].

Stwierdzono, że poza wytwarzaniem kasugamycyny szczep ten wytwarza także aureotrycynę i tiolutynę, podobnie jak *S. kasugaensis*. Jednakże *S. kasugaensis* można wyraźnie odróżnić od *S. kasugaspinus*, ze względu na różnice w powierzchni zarodnika, ponieważ pierwszy ma powierzchnię gładką, a drugi urzęsioną. Określenie *Streptomyces kasugaspinus* nie obejmuje wyłącznie actinomycetes, które niezmiennie i dokładnie odpowiadają powyższemu opisowi, lecz obejmuje także opisane ustroje i ich mutanty, które posiadają w pełni takie same własności, włączając w to urzęsioną powierzchnię zarodnika i wytwarzanie kasugamycyny. Zrozumiałym jest, że określenie *Streptomyces kasugaspinus* obejmuje także mutanty naturalne *S. kasugaspinus* oraz takie, które można z nich otrzymać za pomocą czynników lub substancji, powodujących mutację takich, jak naświetlanie lub poddanie działaniu toksyn.

Gdy szczep wyodrębniono z gleby i hodowano na pożywce, składającej się z maltozy, mączki sojowej 3,0% K_2HPO_4 0,1%; $\text{HgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1%; NaCl 0,3%; $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0007%; $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0002%; peptonu 0,5%; CaCO_3 0,35%; i oleju sojowego 0,08% przy $\text{pH} = 7,0$, na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej (o amplitudzie 8 cm; 140 obrotów na minutę), w temperaturze 27°C — w ósmym dniu hodowli w 1 ml brzezki otrzymano 600 mcg kasugamycyny. Gdy szczep dobrano na drodze selekcji poszczególnych zarodników i hodowano w taki sam sposób, jak opisano powyżej, ale stosując pożywkę, składającą się z 5% mączki sojowej i 4,0% oleju sojowego przy nie korygowanej wartości pH , wówczas wytwarzało się 3950 mcg/ml kasugamycyny. Tak więc oczywistym jest, że

5

szczepy wytwarzające duże ilości kasugamycyny można otrzymać przez właściwy ich dobór.

Sposób według wynalazku polega na tym, że *Streptomyces Kasugaspinus* poddaje się głębokiej hodowli aerobowej w temperaturze 27°C w środowisku, zawierającym jako źródło azotu nieorganiczne lub organiczne związki azotowe, a jako środek węgla węglowodany lub tłuszcze. Wytworzoną kasugamycynę wyosabia się następnie drogą adsorpcji za pomocą węgla aktywowanego lub żywicznych wymienników jonowych i następnie eluuje w znany sposób.

Przykład I. W kolbach o pojemności 500 ml umieszcza się po 125 ml pożywki, zawierającej 4% maltozy, 3,0% mączki sojowej, 0,1% K_2HPO_4 , 0,1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,3% $NaCl$, 0,0007% $CuSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,001% $FeSO_4$, 0,0008% $MnCl_2 \cdot 7H_2O$, 0,0002% $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$; 0,5% peptonu; 0,35% $CaCO_3$ i 0,08% oleju sojowego. Wartość pH doprowadza się do 7,4 i następnie kolby umieszcza w autoklawie i utrzymuje w temperaturze 120°C w ciągu 20 minut. Na tak wyjałowioną pożywkę posiewa się szczep z kultury skośnej za pomocą uszka platynowego. Prowadzi się hodowlę na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej w temperaturze 27°C w ciągu 5 dni. Piątego dnia wartość pH dochodzi do 7,6.

Sfermentowaną brzeczkę filtruje się, aby usunąć grzybnię, po czym dodaje się 1 n roztworu kwasu solnego, w celu wytrącenia części nierozpuszczalnych przy wartości pH = 0,5 i filtruje ponownie, uzyskując 450 ml klarownego roztworu. Przesącz ten zawiera ogółem 360 mg kasugamycyny. Przesącz przepuszcza się przez kolumnę o średnicy 1,2 cm, wypełnioną 35 ml kationitu (Amberlite XE — 100, produkcji Amberlite, typu amonowego). Zaadsorbowaną na jonicie kasugamycynę wymywa się 0,5 n roztworem wodorotlenku amonu. Czynny eluat o objętości 90 ml zawiera ogółem 300 mg kasugamycyny. Przepuszcza się go przez kolumnę o średnicy 0,8 cm, wypełnioną 1 g węgla aktywnego. Po przemyciu kolumny 50 ml wody demineralizowanej wymywa się kasugamycyną 0,5 n HCl , otrzymując chlorowoderek kasugamycyny. 30,2 ml czynnego eluatu zawiera ogółem 180 mg kasugamycyny. Odparowuje się go na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem i w temperaturze poniżej 40°C. Do 5 ml koncentratu dodaje się 10-ciokrotną objętość etanolu w celu wytrącenia kasugamycyny. Wytrąconą kasugamycynę suszy się i otrzymuje 140 mg surowych kryształów, zawierających 132 mg kasugamycyny. Surowe kry-

6

ształy rozpuszcza się w 8 ml wody, dodaje 12 ml etanolu i pozostawia w temperaturze pokojowej, otrzymując 96 mg krystalicznej kasugamycyny. Na podstawie widma w podczerwieni, chromatografii bibułowej, chromatografii cienkowarstwowej, elektroforezy wysokonapięciowej i analizy elementarnej stwierdzono, że produkt ten jest identyczny z chlorowodorkiem kasugamycyny.

Przykład II. W kolbach z doszlifowanym korkiem o pojemności 500 ml umieszcza się po 80 ml pożywki, zawierającej 5% mączki sojowej i 4% oleju sojowego, po czym, nie korygując wartości pH, każdą pożywkę posiewa się szczepem. Prowadzi się hodowlę w temperaturze 27°C na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej o amplitudzie 8 cm i 144 obrotach na minutę. W ósmym dniu hodowli wartość pH dochodzi do 7,5 i otrzymuje się 3570 mcg/ml kasugamycyny. W celu usunięcia grzybni 920 ml sfermentowanej brzeczkii odwirowuje się. Otrzymana klarowna ciecz zawiera 3570 mcg/ml antybiotyku. Dodaje się do niej 400 ml eteru etylowego w celu usunięcia pozostałego oleju. Dolną warstwę oddziela się i odparowuje z niej eter etylowy, uzyskując 4250 mcg/ml antybiotyku. Ciecz tę przepuszcza się przez kolumnę chromatograficzną o średnicy 3,2 cm, wypełnioną węglem aktywnym. Po przemyciu kolumny wodą wymywa się ją 0,05 n roztworem kwasu solnego i zbiera frakcje czynne. Po zubożeniu frakcje czynne stęża się do objętości 20 ml i dodaje się alkoholu etylowego w celu wytrącenia surowego produktu. Surowy produkt rozpuszcza się w 20 ml wody, dodaje 35 ml alkoholu etylowego i odstawia na noc. Otrzymuje się 2,65 g krystalicznej substancji, identycznej z chlorowodorkiem kasugamycyny pod względem temperatury topnienia, skręcalności optycznej, widma w podczerwieni i innych właściwości.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania antybiotyku kasugamycyny, **znamienny tym**, że szczep *Streptomyces kasugaspinus* poddaje się głębokiej hodowli aerobowej w temperaturze 27°C w środowisku zawierającym mikroorganiczne lub organiczne związki azotowe jako źródło azotu i węglowodany, lub tłuszcze jako źródło węgla, po czym wytworzoną kasugamycynę wyosabia się ze środowiska przez adsorpcję węglem aktywowanym lub za pomocą żywicznego wymiennika jonowego i następnie eluuje w znany sposób.

