

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

Egz. SŁUŻBOWY

67 161

Patent dodatkowy
do patentu _____

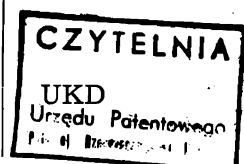
Kl. 30h,6

Zgłoszono: 12.V.1970 (P 148 418)

Pierwszeństwo: _____

MKP C12d 9/14

Opublikowano: 5.VII.1973



Współtwórcy wynalazku: Marian Tyc, Teodora Kadzikiewicz, Kazimierz Woźniak, Andrzej Korona, Anna Sokół, Sławomir Ulikowski, Barbara Borowska

Właściciel patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego, Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania wiomycyny

1

W opisie patentowym nr 66255 opisany jest sposób otrzymywania mutantów o zwiększonej zdolności wytwarzania antybiotyków z grupy polipeptydów polegający na poddawaniu komórek drobnoustroju działaniu czynników mutagennych, wysiewaniu na agarowe podłoże hodowlane, inkubowaniu w termostacie, przesiewaniu metodą replik wyrośniętych kolonii na podłoże syntetyczne zawierające jako jedyne źródło azotu aminokwasy, ponownej inkubacji w termostacie, izolacji z płytek matrycowych tych kolonii, które nie wyrastają lub mają ograniczony wzrost na podłożu syntetycznym i porównaniu metodą fermentacji aktywności antybiotycznej wyizolowanych populacji z aktywnością szczepu wyjściowego, przy czym podłoże syntetyczne zawiera jako jedyne źródło azotu aminokwasy lub ich analogi tworzące łańcuch polipeptydowy w cząsteczce wytwarzanego przez drobnoustroj antybiotyku.

Szczepy wytwarzające wiomycynę opisano po raz pierwszy w 1951 r. niezależnie od siebie, prawie równocześnie w trzech laboratoriach i nazwano je *Streptomyces floridiae* (Am. Rev. Tuberc., 1951, 63, 4), *Streptomyces vinaceus* (U.S. Patent nr 2.633 445) i *Streptomyces puniceus* (Am. Rev. Tuberc., 1951, 63, 1). Burkholder i współpracownicy (Bull. Torrey Botan. Club., 1955, 82, 108) na podstawie porównawczych badań taksonomicznych stwierdzili, że szczepy wytwarzające wiomycynę opisane pod różnymi nazwami, nie wykazują istot-

2

nych różnic taksonomicznych i sklasyfikowali je jako *Streptomyces griseus* var. *purpureus*. Zdaniem Waksmana (The Actinomycetes, T. II, str. 186) nazwy *Streptomyces floridiae*, *Streptomyces vinaceus*, *Streptomyces puniceus*, *Streptomyces griseus* var. *purpureus* i *Streptomyces californicus* są synonimami i wszystkie wyżej wymienione szczepy należą do jednego gatunku, dla którego Waksman proponuje nazwę *Streptomyces californicus*. W 1957 r. Arai i współpracownicy otrzymali wiomycynę z przesączu hodowli *Streptovorticillus olivoreticuli*, który różni się od innych promieniowców wytwarzających wiomycynę wyglądem strzępek sporonośnych.

Obecnie stwierdzono, że otrzymany sposobem opisanym w opisie patentowym nr 66255 mutant szczepu *Streptomyces griseus* var. *purpureus* wytwarza w hodowli głębinowej zwiększone ilości wiomycyny około 6000 j/ml, wykazuje właściwości szczepu produkcyjnego oraz różni się od opisanych szczepów wytwarzających wiomycynę właściwościami taksonomicznymi. Poziom wydajności antybiotyku, jaki otrzymuje się przy użyciu otrzymanego mutantu, nazwanego *Streptomyces I_{25/16/6}*, jest znacznie wyższy w porównaniu z wydajnościami notowanymi w piśmiennictwie patentowym i naukowym. Dodatkową zaletą szczepu *Streptomyces I_{25/16/6}* jest to, że wysokie wydajności antybiotyku uzyskuje się przy bardzo niskich kosztach pożywek hodowlanych i produkcyjnych.

W tablicach 1 i 2 zestawiono właściwości morfologiczne, hodowlane i fizjologiczne szczepu *Streptomyces* I_{25/16/6} i wzorcowego szczepu *Streptomyces*

tomyces griseus var. *purpureus*, które określono za pomocą testów stosowanych do różnicowania gatunków rodzaju *Streptomyces*.

Tablica 1
Właściwości badanych szczepów na podłożach różnicujących

Podłoże	Cecha hodowli	<i>Streptomyces griseus</i> var. <i>purpureus</i>	<i>Streptomyces</i> I _{25/16/6}
Agar drożdżowo-słodowy	wzrost	++++	++++
	zarodn.	+++	+++
	pigm. rozp.	brak	brak
	g. podst.	buraczkowa	żółtobrazowa
	g. pow.	szarobiała z odcieniem lila-róż, sporofory proste (R) i faliste (F), zarodniki występują w łańcuszkach zawierających więcej niż 10 zarodników	szarobiała, sporofory proste (R) i faliste (F), zarodniki występują w łańcuszkach zawierających więcej niż 10 zarodników
Agar z mąką owsianą	wzrost	++++	++
	zarodn.	++++	++
	pigm. rozp.	brak	brak
	g. podst.	buraczkowa	beżowa
	g. pow.	lila-róż, sporofory proste (R) i faliste (F).	szarobiała, sporofory proste (R) i faliste (F).
Agar skrobiowy z solami nieorganicznymi	wzrost	++++	++
	zarodn.	++	+
	pigm. rozp.	brak	brak
	g. podst.	buraczkowa	beżowa
	g. pow.	szara, sporofory proste (R) i faliste (F)	
Agar asparaginowy z glicerolem	wzrost	++++	+++
	zarodn.	++++	++
	pigm. rozp.	brak	brak
	g. podst.	buraczkowa	beżowobrazowa
	g. pow.	białoszara, sporofory proste (R) i faliste (F)	szarobiała, sporofory proste (R) i faliste (F)

Objaśnienie:

zarodn. = zarodnikowanie
 pigm. rozp. = pigment rozpuszczalny
 g. podst. = grzybnia podstawowa
 g. pow. = grzybnia powietrzna
 ++++ = wzrost obfity
 +++ = „ dobry
 ++ = „ średni
 + = „ skąpy

Tablica 2

Właściwości fizjologiczne badanych szczepów

Podłoże	Cecha hodowli	<i>Streptomyces griseus</i> var. <i>purpureus</i>	<i>Streptomyces</i> I _{25/16/6}
Agar peptonowo-drożdżowy z cytrynianem żelazowo-amonowym	wytwarzanie pigmentu typu melaniny	nie wytwarza	wytwarza brązowy pigment
Bulion tryptonowy z wyciągiem drożdżowym	wytwarzanie pigmentu typu melaniny	nie wytwarza	wytwarza brązowy pigment
Podłoże syntetyczne zawierające argininę	wzrost	wzrost dobry	nie rośnie (lub wzrost ograniczony)
Podłoże syntetyczne zawierające lizynę	wzrost	wzrost dobry	nie rośnie (lub wzrost ograniczony)
Podłoże syntetyczne zawierające β-alaninę	wzrost	wzrost dobry	nie rośnie (lub wzrost ograniczony)

Badane szczepy zachowywały się podobnie pod względem wykorzystywania różnych źródeł węgla z podłoży syntetycznych.

Tablica 3

Właściwości ciemnobrązowego pigmentu wytwarzanego przez szczep *Streptomyces* I_{25/16/6}

Lp.	Właściwość	Pigment ciemnobrązowy z hodowli szczepu I _{25/16/6}
1.	Wytrącanie metodą Blackberga-Wagnera	wytrąca się
2.	Barwa	brązowo-czarna
3.	Rozpuszczalność w wodzie	nie rozpuszcza się
4.	Rozpuszczalność w 1M NaOH	rozpuszcza się
5.	Wytrącanie za pomocą HCl z roztworu 1M NaOH	wytrąca się
6.	Wytrącanie za pomocą FeCl ₃	wytrąca się
	Rozpuszczalność osadu w 1n NaOH	rozpuszcza się
7.	Redukcja dwutlenkiem sodu Reoksydacja żelaziciankiem potasu	barwa czarnobrązowa → jasnobrązową
		jasnobrązowa → czarnobrązową
8.	Spektrum w nadfiolecie	W zakresie 215—450 mμ nie wykazuje charakterystycznych maksimów. Krzywa absorpcji jest taka sama jak opisana przez Schmidliego krzywa dla pigmentu melanicznego (Helv. Chim. Acta, 1955, 38, 1078)

Wyniki badań przedstawione w tablicach 1 i 2 wskazują, że szczep I_{25/16/6} różni się od szczepu *Streptomyces griseus* var. *purpureus* zabarwieniem grzybni powietrznej, zabarwieniem grzybni podstawowej, wytwarzaniem pigmentu typu melaniny oraz zdolnością asymilacji niektórych aminokwasów z podłoża syntetycznego. Większość wymienionych cech stanowi podstawowe kryteria w klasyfikacji gatunków rodzaju *Streptomyces*. Różnice,

60 jakie stwierdzono, są tak znamienne, że z punktu widzenia zasad obecnej taksonomii promieniowców (bez uwzględnienia kryteriów ekologicznych) szczep I_{25/16/6} należałoby uznać za nowy gatunek.

65 Jednym z podstawowych kryteriów przy różnicowaniu gatunków rodzaju *Streptomyces* jest zdolność wytwarzania pigmentu typu melaniny, której nie wykazują dotychczas opisane szczepy z rodzaju *Streptomyces* wytwarzające wiomycynę. Celem

stwierdzenia, czy szczep $I_{25/16/6}$ istotnie wytwarza pigment melaninowy przeprowadzono próby izolacji pigmentu z hodowli *Streptomyces* $I_{25/16/6}$ prowadzonej na podłożu o następującym składzie: wyciągu drożdżowego 0,1%, DL tyrozyny 0,1%, NaCl 0,85%, wody destylowanej do 100%. Wyniki badań podane w tabeli 3 wskazują na to, że pigment ciemnobrązowy wytwarzany przez szczep *Streptomyces* $I_{25/16/6}$ należy do grupy melanin.

Szczep *Streptomyces* $I_{25/16/6}$ jest stabilny pod względem cechy wytwarzania wiomycyny. Kilkakrotne pasażowanie szczepu $I_{25/16/6}$ na podłożu agarowym oraz przechowywanie hodowli agarowej w ciągu kilku tygodni w temperaturze 2–4°C, jak również przechowywanie szczepu w postaci zliofilizowanej, nie wpływało na obniżenie jego aktywności antybiotycznej.

Szczep *Streptomyces* $I_{25/16/6}$ można rozmnażać na podłożu agarowym (sporulacyjnym) zawierającym naturalne źródła azotu (np. wyciąg kukurydzy, wyciąg słodowy i inne wyciągi roślinne i zwierzęce), oraz siarczan amonowy lub azotany. Źródłem węgla mogą być cukry proste lub wielocukry. Ponadto agarowe podłoże sporulacyjne może zawierać dodatek soli mineralnych oraz dodatek mikroelementów.

Dobrze sporulujące hodowle agarowe szczepu $I_{25/16/6}$ są wyjściowym materiałem szczepiennym do wytwarzania wiomycyny od skali laboratoryjnej do skali przemysłowej.

Szczep *Streptomyces* $I_{25/16/6}$ przechowuje się na agarowym podłożu sporulacyjnym lub w postaci zliofilizowanej. Hodowle na podłożu sporulacyjnym można przechowywać w temperaturze 2–4°C przez co najmniej 2 miesiące bez utraty aktywności. Zarodniki szczepu $I_{25/16/6}$ można zliofilizować w odpowiednich nośnikach (np. 20% surowica końska, mleko odtłuszczone, roztwór zawierający 10% sacharozy i 1% żelatyny) dla zmniejszenia odsetka śmiertelności przy przywracaniu zliofilizowanego materiału do stanu pierwotnego. Stwierdzono, że dobrym nośnikiem dla zarodników szczepu $I_{25/16/6}$ jest mleko odtłuszczone. Wilgotność końcowa zliofilizowanego materiału powinna wynosić około 1%. Ampułki zawierające liofilizat powinny być szczelnie zatopione pod zmniejszonym ciśnieniem wynoszącym setne części mm słupa Hg. W postaci zliofilizowanej szczep $I_{25/16/6}$ zachowuje żywotność i aktywność antybiotyczną przez co najmniej 2 lata.

Sposób wytwarzania wiomycyny przy zastosowaniu szczepów otrzymanych sposobem opisanym w opisie patentowym nr 66255 polega na prowadzeniu procesu biosyntezy przy użyciu szczepu *Streptomyces* $I_{25/16/6}$ lub jego wariantów, w temperaturze poniżej 35°C, korzystnie 27–28°C, na odpowiednich pożywkach zawierających przyswajalne źródła azotu i węgla pochodzenia roślinnego i/lub zwierzęcego oraz sole mineralne, przy równoczesnym mieszaniu i napowietrzaniu, w czasie potrzebnym do wytworzenia antybiotyku, który izoluje się znanymi metodami.

Jako źródło azotu stosuje się mąkę rybną, drożdże, wyciąg drożdżowy, wyciąg namokowy kukurydzy, odtłuszczonej mąkę sojową, wyciągi i hydro-

lizaty z mąki sojowej, mąkę z nasion słonecznikowych, mąkę z orzeszków ziemnych, wyciągi i hydrolizaty z orzeszków ziemnych i/lub siarczan amonowy albo azotany. Dodatek niektórych z wymienionych źródeł azotu np. wyciągu namokowego kukurydzy lub NaNO_3 do pożywki posiada pobudzający wpływ na wytwarzanie antybiotyku przez szczep $I_{25/16/6}$.

Jako źródło węgla stosuje się korzystnie rozpuszczalne lub nierozpuszczalne węglowodany, np. glukoza techniczna, sacharoza i inne cukry proste lub ich mieszaniny, skrobię, mąkę ziemniaczaną, mąkę kukurydzianą lub ich mieszaniny z wymienionymi uprzednio cukrami prostymi. Jako źródło węgla stosuje się również oleje roślinne, np. sojowy, lub tłuszcze zwierzęce, np. smalec spożywczy.

Pożywki płynne do produkcji wiomycyny szczepi się inoculum konidialnym lub wegetatywnym. Inoculum konidialne stanowią zarodniki zebrane z 5–10 dniowej hodowli na podłożu sporulacyjnym. Jako inoculum wegetatywne używa się 42–48 godz. hodowli głębinowej. Fermentację przeprowadza się w temperaturze poniżej 35°C (korzystnie 27°–29°C) przy jednoczesnym mieszaniu i napowietrzaniu w aparaturze powszechnie stosowanej w przemyśle fermentacyjnym.

Zwykle po 115–139 godzinach fermentacji wydajność wiomycyny w kolbach na trzęsawce obrotowej o 240 obr/min przy zastosowaniu szczepu *Streptomyces* $I_{25/16/6}$ wynosi około 6000 j/ml. Po zakończeniu procesu fermentacji w brzeczka fermentacyjnych szczepu $I_{25/16/6}$ stwierdza się za pomocą chromatografii bibułowej w układzie rozwijającym: n-propanol: woda: 80% kwas octowy (12,5:12,5:1) — obecność tylko jednej substancji przeciwbakteryjnej, przy biologicznym wywoływaniu chromatogramu za pomocą *Bacillus subtilis* 6633. Położenie substancji aktywnej na pasku bibuły odpowiada położeniu strefy zahamowania, wywołanej przez wiomycynę. Z płynu pofermentacyjnego szczepu $I_{25/16/6}$ wiomycynę można wydzielić znanymi metodami.

Dalsze szczegóły znajdują się w przykładach, które służą do objaśnienia sposobu wynalazku, lecz nie stanowią jego ograniczenia. Podane w przykładach procenty oznaczają procenty wagowe.

Przykład I

Fermentacja w kolbach na trzęsawce.

Stadium posiewowe I. Kolby Erlenmayera o poj. 500 ml zawierające 50 ml pożywki posiewowej o składzie niżej podanym:

Skład pożywki posiewowej nr 1

Mąka sojowa odtłuszczone	3,0%
glukoza techniczna	2,0%
wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy)	0,3%
NaNO_3 techniczny	0,6%
NH_4NO_3 „	0,4%
skrobia ziemniaczana	1,0%
Olej sojowy surowy	0,5%
Woda wodociągowa do	100%

Po sterylizacji wartość pH wynosiła 6,8. Sterylizowano w temperaturze 117°C w ciągu 30 min.

Skład pożywki posiewowej nr 2

Mąka sojowa odtłuszczona	3,0%
Glukoza techniczna	3,0%
$/\text{NH}_4/2\text{SO}_4$	0,3%
CaCO_3	0,3%
KH_2PO_4	0,05%
NaCl	0,25%
Woda wodociągowa do	100%

(Po sterylizacji wartość pH wynosiła 6,7. Sterylizacja jak wyżej).

Zaszczepiono zarodnikami zebranych oczkiem ezy z 9 dniowej hodowli agarowej szczepu *Streptomyces I_{25/18/6}* i wstawiono na trzęsawkę obrotową o 240 obr./min. Inkubowano w temperaturze 28°C w ciągu 47 godzin. Hodowlą otrzymaną w ten sposób służyła jako inoculum dla stadium posiewowego II.

Stadium posiewowe II. Do kolb Erlenmayera o poj. 500 ml zawierających po 50 ml pożywki posiewowej nr 1 lub nr 2 dodano po 2 ml hodowli stadium posiewowego I. Hodowlę prowadzono w temperaturze 28°C na trzęsawce obrotowej o 240 obr./min w ciągu 45 godzin. Hodowlą stadium II szczepiono pożywkę produkcyjną nr 1 lub nr 2.

Stadium produkcyjne. Do kolb Erlenmayera o poj. 500 ml zawierających po 40 ml pożywki produkcyjnej nr 1 lub nr 2 o składzie niżej podanym:

Skład pożywki produkcyjnej nr 1

Mąka sojowa odtłuszczona	3,0%
Glukoza techniczna	3,0%
Skrobia	1,0%
CaCO_3	0,3%
NaNO_3 techniczny	0,6%
NH_4NO_3 „	0,4%
KH_2PO_4	0,01%
Wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy)	0,05%
Olej sojowy surowy	1,0%
Woda wodociągowa do	100%

(Po sterylizacji wartość pH wynosiła 6,6. Sterylizacja jak wyżej).

Skład pożywki produkcyjnej nr 2

Mąka sojowa odtłuszczona	4,0%
Glukoza techniczna	5,0%
Wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy)	0,3%

CaCO_3	0,4%
$/\text{NH}_4/2\text{SO}_4$	0,4%
NaNO_3	1,0%
Olej sojowy surowy	0,5%
Woda wodociągowa do	100%

(Po sterylizacji wartość pH wynosiła 6,5. Sterylizacja jak wyżej).

Dodano hodowlę stadium II w ilości 8% w stosunku do objętości pożywki. Fermentację prowadzono w temperaturze 28°C na trzęsawce obrotowej o 240 obr./min. Po zakończeniu fermentacji (125 godz.) płyny pofermentacyjne zawierały około 6000 j/ml wiomycyny.

Przykład II. Fermentacja w fermentorach.

Materiał szczepienny przygotowywano w kolbach na trzęsawce w sposób podany w przykładzie I (stadium posiewowe I i stadium posiewowe II).

W fermentorze o pojemności 20 l przygotowano 12 l pożywki nr 1 lub nr 2 i sterylizowano ją w 120°C w ciągu 1 godziny. Po sterylizacji wartość pH wynosiła 6,7. Wyjałowioną pożywkę zaszczepiono inoculum (stadium posiewowe II) w ilości 5% w stosunku do objętości pożywki. Fermentację prowadzono w temperaturze 28°C, przy stałym napowietrzaniu wynoszącym 1 objętość powietrza na 1 objętość pożywki i przy stałym mieszaniu (500 obr./min. W 120 godz. fermentacji przesącze brzeczek fermentacyjnych zawierały w 1 ml około 6000 j wiomycyny. Oznaczenie wiomycyny przeprowadzano metodą biologiczną płytkowocylinderkową używając jako szczepu testowego *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Z płynów pofermentacyjnych wiomycynę izolowano znanymi sposobami.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania wiomycyny przy zastosowaniu szczepów *Streptomyces*, **znamienny tym**, że proces biosyntezy prowadzi się przy użyciu szczepu *Streptomyces I_{25/18/6}* w temperaturze poniżej 35°, korzystnie 27 — 28°C, na odpowiednich pożywkach zawierających przyswajalne źródła azotu i węgla pochodzenia roślinnego i/lub zwierzęcego oraz sole mineralne, przy równoczesnym mieszaniu i napowietrzaniu, w czasie potrzebnym do wytwarzania antybiotyku, który izoluje się znanymi sposobami.

ERRATA

Lam 7, wiersz 5
jest: NaCl
powinno być: NaCl
Lam 8, wiersz 64
jest: wartość pH wynosiła 6,8.
powinno być: wartość pH wynosiła 6,6.
Lam 9, wiersz 12
jest: szczepu Sterpto-
powinno być: szczepu Strepto-