



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 43499

Kl. 6 b, 16/03

Instytut Antybiotyków

Warszawa, Polska

Sposób otrzymywania tetracykliny

Patent trwa od dnia 20 czerwca 1959 r.

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania tetracykliny za pomocą nieznanego dotychczas szczepu *Streptomyces* species 88, wyizolowanego z gleby w Polsce.

Antybiotyk tetracyklina produkowany jest przez szczepy rodzaju *Streptomyces*. Dotychczas tetracyklinę otrzymuje się na drodze fermentacji trwającej 48 godzin, w temperaturze 25–30°C, przy czym powstały antybiotyk jest niejednorodny, ponieważ zawiera znaczne ilości chlorotetracykliny (które można zmniejszyć dodaniem substancji blokujących). Ponadto breczki otrzymywane w wyniku fermentacji przy użyciu wyżej wymienionych szczepów zawierają bliżej nieokreślone produkty metabolizmu, które nastręczają trudności w toku dalszej przeróbki, ze względu na tworzenie w fazach pośrednich emulsji i osadów. Pociąga to za sobą konieczność użycia skomplikowanej aparatury do rozdzielenia i zwiększa ilość operacji niezbędnych do uzyskania gotowego produktu.

Wynalazek ma na celu znaczne skrócenie

czasu fermentacji, otrzymanie breczki fermentacyjnej zawierającej wyłącznie tetracyklinę, bez konieczności dodawania inhibitorów hamujących powstawanie chlorotetracykliny i wyeliminowanie powstających w dotychczas opracowanych procesach bliżej nieokreślonych ubocznych produktów metabolizmu, wywołujących omówione trudności w procesie przerobu breczki fermentacyjnej.

Cel ten udało się osiągnąć według wynalazku przez zastosowanie w procesie produkcyjnym szczepu *Streptomyces* species 88, wyizolowanego z gleby w Polsce oraz ustalenie warunków, w których szczep ten wytwarza największą ilość antybiotyku. Szczep ten różni się od dotychczas opisanych producentów tetracykliny, jak to wynika z podanych niżej tablic.

Charakterystyka szczepu na agarze: gliceryna — 1%, asparagina — 0,05%, ekstrakt mięsny — 0,2%, K_2HPO_4 — 0,05%, agar — 1,5%, pH = 7,2.

	Szczep <i>Streptomyces aureofaciens</i>	Szczep <i>Streptomyces species</i>
Wzrost	dobry	dobry
Zarodnikowanie	dobrze	dobrze
Pigment rozpuszczalny	brak	brązowo-zielony
Grzybnia powietrzna	strzępki proste grzybnia szara	strzępki proste grzybnia brudno-różowa.

Na agarze Czapek — Dox, dekstryna — 1%, NaNO_3 — 0,2%, K_2HPO_4 — 0,1%, MgSO_4 — 0,05%, KCl — 0,05%, FeSO_4 — ślady, agar — 1,5%, pH = 7,2.

	Szczep <i>Streptomyces aureofaciens</i>	Szczep <i>Streptomyces species</i>
Wzrost	umiarkowany	umiarkowany
Zarodnikowanie	słabe	słabe
Pigment rozpuszczalny	brak	żółcisto-pomarańczowy
Grzybnia powietrzna	barwy skórza-sto-brązowej. Strzępki cienkie w bardzo małej ilości.	intensywnie pomarańczowy
Rozpuszczalność żelatyny	nie rozpuszcza	nie rozpuszcza
Koagulacja mleka lakmowego	nie koaguluje	koaguluje
Hydroliza skrobi	słabo	słabo
Wzrost i barwa na pożywce ziemniaczanej	dobry, ciemno-szara	dobry, ciemno-szara
Redukcja azotanów	nie redukuje	nie redukuje
Pożywka produkcyjna z chlorkiem sodu	śląd tetracykliny	śląd chlorotetracykliny, śląd niezidentyfikowanych antybiotyków x i y

	Szczep <i>Streptomyces aureofaciens</i>	Szczep <i>Streptomyces species</i>
Chromatografia w układzie octanu etylu nasyconego wodą	chlorotetracyklina, śląd tetracykliny	chlorotetracyklina, — śląd, tetracyklina, antybiotyk x, antybiotyk y
R_F w stosunku do chlorotetracykliny	R_F — 1 chlorotetracyklina R_F — 0,4 tetracyklina	R_F — 1 chlorotetracyklina R_F — 0,4 tetracyklina R_F — 0,26 antybiotyk x R_F — 0,15 antybiotyk y

Wyizolowany szczep służył do otrzymania mutantów produkcyjnych na drodze selekcji przy zastosowaniu wstępnych czynników mutagennych takich jak: promienie ultrafioletowe, promienie X, dwumetyloimina oraz innych znanych czynników.

Szczep może być przechowywany w stanie zliofilizowanym w ciągu 2 lat nie tracąc swojej aktywności.

Jak stwierdzono, obecność produktów owsa w podłożu produkcyjnym, wpływa stymulująco na wzrost grzybni i wydajność antybiotyku.

Do fermentacji głębinowej jako pożywkę zawierającą przyswajalne źródło węgla stosuje się produkty owsa, np. płatki owsiane, poza tym skrobię, dekstrynę, glikozę, sacharozę, melasę itp.

Stwierdzono, iż produkty owsa, między innymi np. płatki owsiane, posiadają działanie stymulujące i własności przeciwpienne.

Jako źródło przyswajalnego azotu stosuje się wyciąg namokowy kukurydzy, mąkę arachidową, mąkę sojową, drożdże itp., zaś jako soli mineralnych NaBr , $\text{NH}_4/2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , NH_4Cl itp.

Odpowiednie stężenie jonów wodorowych reguluje się dodając CaCO_3 .

Do gaszenia piany stosuje się oleje roślinne.

Według wynalazku fermentację szczepu *Streptomyces species* 88 prowadzi się np. w kadziach żelaznych, najkorzystniej w temperaturze 30 — 32°C, w czasie krótszym niż 48 godzin, najkorzystniej w czasie 30 — 42 godzin przy pH w granicach 5,0 — 7,2. Fermentację prowadzi się w warunkach tlenowych dostarczając od 0,5 do 0,75 objętości powietrza/ob-

jętość podłoża na minutę i stosuje się 1—10,0% inoculum wegetatywnego.

Oznaczanie aktywności płynów fermentacyjnych prowadzi się ogólnie znanymi metodami biologicznymi i fizykochemicznymi. Bardzo ważne jest stosowanie różnych pożywek dla stadiów posiewowych i produkcyjnego.

Krótki czas fermentacji zapobiega autolizie grzybni i przyczynia się do skrócenia czasu i ominięcia trudności związanych z filtracją. W sposobie według wynalazku mimo krótkiego czasu fermentacji uzyskuje się zawartość antybiotyku w brzeczce 3000 — 4000 j/ml — co było niemożliwe do osiągnięcia w tym czasie znanymi dotychczas metodami.

Otrzymany antybiotyk izoluje się z brzeczki w znany sposób, metodą wytrącenia w postaci soli kompleksowej lub metodą ekstrakcji z brzeczki do rozpuszczalników organicznych w środowisku alkalicznym z zastosowaniem przenośników, reekstrakcji do wody i wysalania. W trakcie izolowania antybiotyku nie powstają emulsje ani osady w fazach pośrednich, zarówno przy przejściu antybiotyku do rozpuszczalników organicznych, jak i przy reekstrakcji do fazy wodnej.

Poniżej podano przykłady, które bliżej wyjaśniają sposób według wynalazku.

Przykład I. Szczep *Streptomyces species* 88 hoduje się na podłożu o następującym składzie:

5,0% — otręby pszenne
2,0% — agar — agar

Zarodniki przeszczepia się na podłoże posiewowe o składzie:

3% — glikoza
0,5% — drożdże
1,25% — wyciąg namokowy kukurydzy
0,5% — NH_4NO_3
0,2% — NaCl
0,4% — CaCO_3

wartość pH przed sterylizacją = 7,0.

Podłoże sterylizuje się w temperaturze 110 — 115°C przez 30 minut, a następnie inkubuje w temperaturze 30 — 32°C w ciągu 12—24 godzin.

Tak przygotowany materiał posiewowy przeszczepia się na podłoże produkcyjne o składzie:

2,0% — mąka z wycieków arachidowych
2,0% — mąka ziemniaczana
2,0% — mąka owsiana

1,25% — wyciąg namokowy kukurydzy

0,5% — NH_4NO_3

0,2% — NaCl

0,4% — CaCO_3

0,75% — olej arachidowy

wartość pH przed sterylizacją 6,5.

Fermentację prowadzi się przez 42 godziny w temperaturze 30 — 32°C.

Brzeczkę z kolb w ilości 2,5 l zakwasza się kwasem szczawiowym do pH = 2,0, a następnie sączy z ziemią okrzemkową. Do przesączu dodaje się 0,1% chlorku dwumetylo-laurylobenzyloamoniowego i 20% mieszaniny octanu butylu z butanolem w stosunku 4:1 i doprowadza pH do 8,0 za pomocą NaOH . Po 30 minutach mieszania oddziela się klarowną fazę organiczną. Ekstrakcję przeprowadza się dwukrotnie. Połączone, klarowne fazy organiczne zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem do połowy objętości, a następnie dodaje 10% wody i pH mieszaniny doprowadza do 2,8 przy użyciu H_2SO_4 (1:3). Po dwukrotnej ekstrakcji zbiera się klarowną fazę wodną i dodaje do niej 15% NaCl i pozostawia do krystalizacji. Po odsączeniu otrzymuje się 4,0 g preparatu chlorowodoru tetracykliny c mocy 950 mcg/mg.

Przykład II. Brzeczkę z kolb w ilości 2 l zakwasza się kwasem szczawiowym do pH=2,5 dodaje chlorku dwumetylo-laurylobenzyloamoniowego w ilości 0,1% i doprowadza do pH=8,0, a następnie po dodaniu 0,3% ziemi okrzemkowej i po 0,5 godzinym mieszaniu sączy. Suchą mieszaninę o aktywności około 300 mcg/mg ekstrahuje się metanolem zawierającym 10% CaCl_2 . Ekstrakcję prowadzi się trzykrotnie po 1 godzinie. Ekstrakty łączy się, zagęszcza do uzyskania około 100.000 mcg/ml, a następnie zakwasza stężonym HCl do wytrącenia kryształów chlorowodoru tetracykliny. Otrzymuje się 0,52 g krystalicznego osadu o mocy 945 mcg/mg.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania tetracykliny na drodze głębinowej fermentacji, w warunkach tlenowych, znamieny tym, że proces biosyntezy prowadzi się w temperaturze 30 — 32°C, w czasie 34 — 40 godzin, przy użyciu szczepu *Streptomyces species* 88, który na podłożu o pH 5,0 — 7,2 zawierającym źródła przyswajalnego węgla, azotu oraz soli mineralnych i między innymi składnikami — produkty owsa, wytwarza bez inhibitorów chlorowania z dużą

wydajnością wyłącznie tetracyklinę, którą izoluje się z przefermentowanego podłoża, zaś w przypadku braku w podłożu produktów owsa wytwarza tetracyklinę, chlorotetracykli-

nę i dwa inne nie zidentyfikowane antybiotyki.

Instytut Antybiotyków

Zastępca: mgr inż. Antoni Sentek
rzecznik patentowy

