

(19) HU
MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



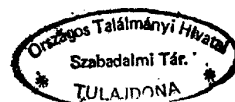
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) (13)
197941 B

(22) A bejelentés napja: 87.04.10. (21) 1616/87
(83) NRRL 18049
(33) US:
(32) 86.04.11.
(31) 850 786

(51) Int.Cl.₄
C 12 P 1/06
A 61 K 35/74



(41) (42) A közzététel napja: 1988 09.28.

(45) Megjelent: 1990.02.26.

(72) Feltalálók:
HAMILL Robert L., Greenwood, KASTNER
Ralph Emil, Indianapolis, Indiana, US

(73) Szabadalmaz:
Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana,
US

(54) ELJÁRÁS A42125 JELE ANTIBIOTIKUM ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás az A42125 je-
lű antibiotikum — mely az alábbi tulajdon-
ságokkal jellemzett:

állapot: fehér kristályos anyag (vízből);
op.: 149—150°C;

UV: nem abszorbeál;

IR (KBr): az 1. ábrán látható;

titráció (80%-os vizes dimetil-formamid);

pKa 5,2, 8,7 és 10,5;

molekulatömeg: 2032 (field deszorpciós
tömegspektrometria alapján);

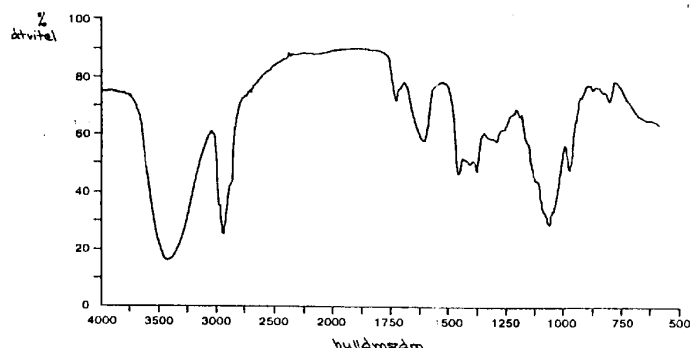
tapasztalati képlet: $C_{101}H_{184}N_2O_{38}$;

aminosav: nem található;

oldhatóság: vízdékony;

— és sói előállítására.

A találmány szerinti eljárást az jellemzi,
hogy a *Nocardia aerocolonigenes* NRRL 18049
mikroorganizmus vagy annak A42125 anti-
biotikumot termelő változatát vagy mutánsát
asszimilálható szénforrást, nitrogénforrást és
szervesen sokat tartalmazó táptalajon, súly-
lyesztett tenyésztetben, aerob körülmények kö-
zött tenyésztik, és kívánt esetben a terméket
is nert módon kinyerik a fermentléből, és/vagy
kívánt esetben sóvá alakítják.



1. ábra

A találmány tárgya eljárás egy új, A42125 jelzésű antibiotikum fermentációs úton történő előállítására az új *Nocardia aerocolonigenes* NRRL 18049 törzs tenyésztésével. Az A42125 antibiotikum különlegesen érdekes tulajdonsága, hogy metántermelő mikroorganizmusokkal szemben hat. Minthogy az A42125 antibiotikum a bendőben uralkodó körülményeket modellező kísérletek során csökkentette a metántermelést, az A42125 antibiotikumnak fokoznia kell a kérődzők tápanyaghasznosítását és növekedését.

Az A42125 antibiotikumot a *Nocardia aerocolonigenes* NRRL 18049 sülyesztett, aerob fermentálásával állítjuk elő. A fermentáléból az antibiotikumot gyantán történő megkötéssel vonjuk ki, majd a gyantáról poláris szerves oldószerekkel oldjuk le. Az A42125 antibiotikum elválasztására és további tisztítására ismert eljárásokat, például ioncserés kromatográfiát, használunk.

A mellékelt ábrán bemutatjuk az A42125 antibiotikum kálium-bromidban felvett infravörös spektrumát.

Az állatgyógyászatnak állandó igénye van új antibiotikumok iránt. Az antibiotikumok alkalmazásának egyik célja az állatok növekedésének meggyorsítása. A növekedés gyorsítása elérhető a betegségek kivédésével és a tápanyaghasznosítás fokozásával. A kérődzőknél — a szarvasmarháknál és a juhoknál — különösen gazdasági érdek a növekedés gyorsítása.

A kérődzők bendőjében élő mikroorganizmusok metabolizálható termékekké, például propionáttá bontják le a szénhidrátokat. Néhány mikroorganizmus azonban e rendszerrel szemben hat. Így például a metanogén vagy metántermelő mikroorganizmusok csökkentik a kérődzők tápanyaghasznosítását. Az A42125 antibiotikum különös előnye, hogy gátolja a metánképző mikroorganizmusokat, és ezáltal serkenktheti a kérődzők növekedését.

Noha a kérődzők emésztőrendszerében a metánképző mikroorganizmusok (archaeobacterium) nem kívánatosak, a földi környezet jelentős tényezői, minthogy ezek katalizálják a biohulladék lebontásának végső, metán keletkezését eredményező lépését. Minthogy a metán üzemanyagként alkalmazható, hozzájárulnak az energiaforrások kérdésének megoldásához. A metántermelés és a metánképzést fokozó eljárások ezért nagy jelentőséggel bírnak.

A metántermelés fokozásának egyik megközelítése a metanogén rendszer genetikai megváltoztatásának kifejlesztése. Ehhez a munkához elengedhetetlenek a szelektálható tulajdonságok, például antibiotikum rezisztencia megléte. Általában találunk a szelektált mutánsok között olyanokat, melyek rezisztensek arra az antibiotikumra, mely egyébként megöli az illető mikroorganizmust. Sajnos a metanogének rezisztensek legtöbb antibiotikumra. Az a tény, hogy az A42125 antibiotikum gátolja a metánképző mikroorga-

nizmusokat, alkalmas lehet szelektálható tulajdonságú mikroorganizmusok kinyerésére és ezáltal a metánképző rendszer genetikai megváltoztatására irányuló munka meggyorsítására.

Az A42125 antibiotikum a következő fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkezik: Állapota: fehér kristályos anyag (vízből ki-kristályosítva),

Op.: 149—150°C

UV: nincs elnyelés

IR(KBr): lásd az 1. ábrát; széles csúcs, mely magába foglalja a 3423, 3413, 3409, 3403, 3398, és 3386 cm^{-1} csúcsokat; 2937, 1720, 1602, 1453, 1408, 1379, 1290, 1192, 1120, 1090, 1064, 971, 870, 830 és 802 cm^{-1} .

Titráció (80%-os vizes dimetil-formamidban): pK_a 5,2, 8,7 és 10,5.

Molekulatömeg: 2032 (field-deszorpciós tömegspektrometria alapján).

Tapasztalati képlet: $\text{C}_{101}\text{H}_{134}\text{N}_2\text{O}_{38}$

Elemanalízis:

mért: C: 59,51, H: 9,05, N: 1,44, O: 30,08%.

Aminosav: nem kimutatott.

Oldhatóság: vízben oldható.

Bioautogáfia: 0,95n nátrium-szulfáttal és 0,05n nátrium-hidrogén-szulfát — vízzel impregnált Whatman No.1 papíron 1,5% nátrium-kloridot tartalmazó 80%-os vizes etanollal futtatva és *Micrococcus luteus*-szal detektálva, az A42125 antibiotikum R_f értéke: 0,46.

A titrációs értékek alapján úgy tűnik, hogy az A42125 antibiotikum egy karboxilcsoporttal, egy amin funkciócs csoporttal, egy fenolos csoporttal rendelkezik, melyek sokat képezhetnek.

A sóképzést felhasználhatjuk az antibiotikum elválasztására, tisztítására, és felszabadítására. Az A42125 antibiotikumok savaddíciós sói ezért a találmány részét képezik. Különösen hasznosak a gyógyászati szempontból alkalmazható savaddíciós sók.

Savaddíciós sókhoz jutunk, ha az antibiotikumot a szokásos reakciókörülmények között szerves vagy szervetlen savakkal, például kénsavval, sósavval, foszforsavval, ecetsavval, borostyánkőssavval, citromsavval, tejsavval, maleinsavval, fumársavval, palmitinsavval, kólsavval, pamoinsavval, mucinsavval, D-glutamin-savval, d-kámforsavval, glutársavval, glikolsavval, ftálsavval, borkőssavval, hangyasavval, laurilsavval, sztearinsavval, szalicilsavval, metán-szulfonsavval, benzol-szulfonsavval, szorbinsavval, pikrinsavval, benzooesavval, cinnaminsavval, stb. reagáltatjuk.

Az állatgyógyászatban rendszerint nincs túl nagy jelentősége, hogy az antibiotikumot milyen formában alkalmazzuk. A legtöbb esetben a beadás után az állatban megváltozik az antibiotikum állapota, ezért általában mindegy, hogy milyen só formájában alkalmazzuk. Hogy milyen sót választunk, azt a gazdasági, kényelmi és toxikológiai szempontok határozzák meg.

Az A42125 antibiotikumot termelő *Nocardia aerocolonigenes* törzset alkalmas táptalajon, sülttésztesztetben tenyésztünk aerob körülmények között, amíg megfelelő mennyiségű antibiotikum termelődik. Az A42125 antibiotikumot ismert izolálási és tisztítási eljárásokkal nyerjük ki.

Az A42125 antibiotikumot termelő *Nocardia aerocolonigenes* törzset Braziliából származó talajmintából izolálták. A *N.aerocolonigenes* törzset A42125 jelzéssel láttuk el.

A mikroorganizmus rendszertani meghatározását a Lilly Research Laboratories munkatársa, Frederick P. Mertz végezte el. Vizsgálatai alapján a mikroorganizmust a *Nocardia aerocolonigenes* (Shinubo és Kawato) [Pridham és Lyons 1970 (T.G.Pridham, „New names and new combinations in the order Actinomycetales Buchanan 1917”, USDA Tech-Bull. 1424:32, Agricultural Research service, USDA, Washington, D.C., 1970)] egyik új törzsének határozta meg. A rendszertani besorolás egyidőben végzett laboratóriumi összehasonlításokon és hasonló fajok irodalmi ismertetésével történő egybevetésen [M.Goodfellow és K.P.Schaal, „Identification Methods for *Nocardia*, *Actinomyces* and *Rhodococcus*” in F.A.Skinner és D.W.Lovelock ed., „Identification methods for microbiologists” 2. kiadás, Society for Applied Bacteriology Technical Series No. 14., Academic Press Inc., New York, 1979, 261. old.; R.E. Gordon, S.K.Mishra és D.A.Barnett, „Some bits and pieces of the genus *Nocardia*: *N.carnea*, *N.vaccinii*, *N.transvalensis*, *N.orientalis* and *N.aerocolonigenes*”, J.Gen. Microbiol. 109: 69—78 (1978); S.J.Mishra, R.E.Gordon és D.A.Barnett, „Identification of *Nocardia* and *Streptomyces* of medical importance”, J.Clin.Microbiol., 11(6), 728—736 (1980); H.Mordarska és M.Mordarski, „Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria”, J.Gen.Microbiology, 71, 77—86 (1972); R.C.Pittenger és R.B.Bringham, „*Streptomyces orientalis*, n.sp., the source of vancomycin”, Antibiotics and Chemotherapy VI (11), 642—647 (1956); és S.A. Walesman, „The Actinomycetes”, II. kötet, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1961] alapszik.

A rendszertani meghatározásoknál az International Streptomyces Project (ISP) által a *Streptomyces* fajok jellemzésére ajánlott [E.B.Shirling és D.Gottlieb, „Methods for characterization of *Streptomyces* species”, Int. J.Syst. Bacteriol., 16(3): 313—340 (1966)] eljárásokat követtük néhány más vizsgálattal kiegészítve (D.J.Blazevic és G.M.Ederer, „Principles of Biochemical test in diagnostic microbiology”, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1975).

A *Nocardia* fajok jellemzésére Gordon és munkatársai ajánlanak módszereket [R.E.Gordon, D.A.Barnett, J.E.Handerhan és C.H.Pang, „*Nocardia coelica*, *Nocardia autotrophica*, and

the *Nocardia* strain”, Int.J.Syst. Bacteriol., 24(1): 54—63 (1974)].

A rifampinnal és a lizozimmal szembeni rezisztenciát Gordon és Barnett módszerével határoztuk meg [R.E.Gordon és D.A.Barnett, „Resistance to rifampin and lysozyme of strains of some species of *Mycobacterium* and *Nocardia* as a taxonomical tool”, Int.J.Syst. Bacteriol., 27(3): 176—178, (1977)].

A színek megnevezését az ICSS-NBS Centroid Color Charts, standard sample No. 2106 (National Bureau of Standards, 1958, U.S. Department of Commerce, Washington, D.C.) és a Color Harmony Manual (4. kiadás, Color Standard Department, Container Corporation of America, Chicago, Illinois, 1958) alapján végeztük.

A morfológiai vizsgálatokhoz fénymikroszkópot használtunk. A spórák felszíni rajzolatát scanning elektronmikroszkóppal (SEM) állapítottuk meg.

A melanoid-pigment termelését (kromogénitást) az ISP No.1 (tripton/élesztőkivonat), ISP No.6 (pepton/élesztőkivonat/vas/agar), ISP No.7 (tirozinos agar) és módosított ISP No.7 (triozin nélküli) táptalajon határoztuk meg.

A teljes-sejt hidrolizátumban a diamino-pimelinsav (DAP) izomereket és a szénhidrátokat Becker és munkatársai [B.Becker, M.P.Lechevalier, R.E.Gordon és H.A.Lechevalier, „Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates”, Appl. Microbiol. 12: 421—423 (1964)] és Lechevalier [M.P.Lechevalier, „Identification of aerobic *Actinomyces* of clinical importance”, J.Lab. Clin.Med., 71: 934—944 (1968)] kromatográfiás módszerével határoztuk meg.

A mikolinsavak meghatározására Minnikin által leírt technikán alapuló módszert használtuk [D.E.Minnikin, I.G.Hutchinson és A.B.Caldicott, „Thin-Layer chromatography of mycolic acid-containing bacteria”, J.Chrom. 188: 221—233 (1980)].

A keményítőhidrolízist ISP No.4 (szervetlen sók/keményítő/agar) táptalajon vizsgáltuk jóddal kimutatva a keményítő jelenlétét (l. Blazevic és Ederer, fentebb).

A nátrium-klorid-tűrés megállapításához kellő mennyiségű sót adtunk az ISP No.2 agaros táptalajhoz, és a lemezeket 30°C hőmérsékleten inkubáltuk 14 napon keresztül.

Az antibiotikumrezisztencia méréséhez antibiotikumot hordozó korongokat helyezünk a beoltott ISP No.2 agarlemezek felületére.

A foszfataz és ureáz meghatározására Blazevic és Ederer (l. fentebb) által leírt módszereket alkalmaztuk. A proteináz aktivitás kimutatására a zselatinelfolyósítási vizsgálatot használtuk.

Az A42125 törzs komplex és szintetikus táptalajon általában egyaránt jól nő. Élesztő-dextróz agar kivételével valamennyi táptalajon növeszt légmicéliumokat. A spórátó meg színe szürke-fehér. A Tresner és Bachus

rendszerben a legközelebb álló szín a „d light gray” (halványszürke) és a „b oyster white” (osztriga fehér). A fonák oldal színe sárgás-barnától sárgás-fehérig változik. Halvány-

barna oldható pigment termelődik az ISP No.2 és az élesztő-dextrózos agar táptalajon. A kultúrák tulajdonságait az I. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat
Az A42125 törzs, a *Nocardia aerocolonigenes* és a *N. orientalis* telepek jellemzői

Táptalaj	Tulajdonság	A42125	N.orientális	N.aerocolonigenes
ISP-2	N	erőteljes	erőteljes	erőteljes
	F	78.d.yBr	68.s.OY	72.d.OY
	Lm	erőteljes: 5fe †.gy.rBn	erőteljes: 2ba pale yellow (fakósárga)	nincs (redőzött felület)
	Op	halványbarna	nincs	nincs
ISP-3	N	jó	jó	elég jó
	F	89.p.Y.	89.p.Y.	89.p.Y.
	Lm	eleg jo: <u>b</u> oyster white	jo: <u>b</u> oyster white	nincs
	Op	nincs	nincs	nincs
ISP-4	N	jó	erőteljes	jó
	F	77.m.yBr	72.d.OY	90.gy.Y
	Lm	jo: <u>d</u> light gray (halványszürke)	erőteljes: <u>d</u> light gray (halványszürke)	nincs
	Op	nincs	nincs	nincs
ISP-5	N	erőteljes	erőteljes	erőteljes
	F	77.m. yBr	67.brill.OY	88.d.Y
	Lm	erőteljes: <u>b</u> oyster white	erőteljes: <u>2ba</u> pale yellow (fakó sárga)	nincs (redőzött felszín)
	Op	nincs	nincs	nincs
Kalciummalát	N	jó	erőteljes	jó
	F	77.m.yBr	67.brill.OY	88.d.Y
	Lm	jo: <u>b</u> oyster white	erőteljes: <u>2ba</u> pale yellow	nincs
	Op	nincs	nincs	nincs

1. táblázat (folyt.)

Táptalaj	Tulajdonság	A42125	N.orientalis	N.aerocolonigenes
Czapek táp- agar	N F Lm Op	jó 77.m.yBr jó: <u>d</u> light gray nagyon halvány barna	jó 89.p.Y. jó: <u>b</u> oyster white nincs	erőteljes 75.deep yBr nincs (redőzött) halvány sárgas barna
Glükóz/asz- paragin	N F Lm Op	jó 89.p.Y gyenge: <u>d</u> light gray nincs	erőteljes 67.brill.OY erőteljes: <u>2ba</u> pale yellow nincs	jó 88.d.Y nincs nincs
Csapvizes agar	N F Lm Op	jó 92.y.White elég jó: <u>b</u> oyster white nincs	elég jó 93. y Gray gyenge: <u>b</u> oyster white nincs	gyenge 92 y White nincs nincs
élesztő- dextrozis agar	N F Lm Op	erőteljes 78.d. yBr nincs (re- dőzött fe- lület) halvány barna	erőteljes 68.s.OY erőteljes: <u>2ba</u> pale yellow nincs	erőteljes 72.d.OY nincs (redőzött felület) nincs

N: növekedés

F: fonák felszín

Lm: legmicelium

Op: oldható pigment

Az A42125 törzs erőteljes szubsztrát-micélium és meglehetősen erős légmicélium növekedést mutat. Fénymikroszkóp alatt a lég-hifák pókhálószerű megjelenést mutatnak. Ezt a morfológiát a Bergey kézikönyv (R.E. Buchanan és N.E.Gibbons Eds., „Bergey's manual of determinative bacteriology”, 8. kiadás, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974) a nem-streptomycetes csoportba sorolja.

Az ISP No.4 táptalajon nőtt lég-hifák scanning elektromikroszkóppal konídiumokat figyelhetünk meg. A spórák szabálytalan alakúak. A spórafelszín sima [T.G.Pridham, C.W.Hesseltine és R.C.Benedict, „A guide for the classification of Streptomyces

according to selected groups”, Appl. Microbiol. 6: 52—79 (1975)].

A spóra alak megnyújtottól hengeresig változik, a spórák füzért alkotnak, a füzérben több mint 50 spóra található. A spórák mérete: $1,2-0,9 \times 0,5-0,4 \mu\text{m}$, átlagosan $1,1 \times 0,5 \mu\text{m}$.

Süllyesztett, rázott tenyészetben a hifák fragmentálódnak.

Az A42125 tenyészet elbontja a kazeint, elasztint, guanint, hipoxantint és a tirozint, hidrolizálja a kalcium-malátot, DNS-t, esz-kulint és a keményítőt: savat képez az arabinózból, cellobiózból, fruktózból, galaktózból, α -metil-D-glükózidból, glükózból, glicerinnél, inozitolból, laktózból, maltózból, manni-

tolból, mannózból, melibiózból, raffinózból, ramnózból, trehalózból és a xilózból; hasznosítja az acetátot, benzoátot, citrátot, malátot, oxalátot, propionátot, piruvátot, szukcinátot és tartarátot.

Az A42125 tenyészet katalózt, foszfátot, proteinázt, ureázt és melanoid pigmenteket termel, nem rezisztens a rifampinnal szemben, rezisztens viszont a lizozimmal, cefalo-

tinnel, gentamicinnel, linkomicinnel, penicillinnel és tobramicinnel szemben.

5 Az A42125 tenyészet 6%-os nátrium-klorid koncentrációt még elvisel; 15–37°C közötti hőmérsékleten nő, nem éli túl, ha 8 órán keresztül 50°C hőmérsékletnek tesszük ki; hidrolizálja a lefőlőzött tejet, a nitrátot nitráttá redukálja. Ezeket a fiziológiai tulajdonságait a II. és III. táblázatban foglaljuk össze.

2. táblázat

Az A42125 törzs, és ezzel rokon *Nocardia* törzsek morfológiai és fiziológiai tulajdonságai

tulajdonság	A42125	N.aerocolonigenes	N.orientális	N.brasilien-sis
léghifa	+	-	+	-
konídium	+	-	+	-
savmegkötés	-	-	-	-
mikolinsavak a sejtfalban	-	-	-	-
ureáz	+	+	+	+
lebontás				
adenin	-	-	-	-
kazein	+	+	+	+
elasztin	+	-	-	+
hipoxantin	+	+	+	+
tirozin	+	+	+	+
xantin	-	-	-	-
rezisztencia				
lizozim	+	+	-	+
ripamfin	-	-	+	+
Hidrolízis				
kalcium-malát	+	+	+	nv.
eszkulin	+	+	+	+
hippurat	-	-	+	-
keményítő	+	+	+	+
Hasznosítás				
benzoát	+	-	-	-
citrát	+	+	+	+
mukát	-	-	-	-
szukcinát	+	+	+	+
tartarát	+	-	-	-
Nitrát redukció	-	-	+	+
Túlélés 50°C, 8 óra	-	-	+	-
Savképzés				
adonitból	-	-	+	-
1-(+)-arabinozból	+	+	+	-
cellobiozból	+	+	+	+
i-eritritolból	-	-	+	-
glükózból	+	+	+	+
glicerinnél	+	+	+	+
inozitolból	+	+	+	+
α-laktozból	+	+	+	-
maltozból	+	+	+	-
D-mannitból	+	+	+	+
D-mannozból	+	+	+	+
melezitoból	-	-	-	-

2. táblázat (folytatás)

A42125 törzs. es ezzel rokon *Nocardia* törzsek morfológiai és fiziológiai tulajdonságai

melibizból	+	+	-	-
α -metil-glükózidból	+	-	+	-
raffinózból	+	+	-	-
ramnozból	+	+	+	-
szorbitból	-	-	-	-
trehalózból	+	+	+	+
xilózból	+	+	+	-
Növekedés				
10°C	-	+	+	+
45°C	-	-	-	-
50°C	-	-	-	-

+ = a tulajdonság megvan
 - = a tulajdonság hiányzik
 nv = nem vizsgált

III. TÁBLÁZAT

Az A42125 törzs további tulajdonságai

foszfátáz	+	
főzőtt tej hidrolízis	-	30
melanoid-pigment-termelés	+	
zselatinelfolyósítás	+	
NaCl tűrés	6%	
kataláz	+	
lebonítás:		35
kitin	-	
DNS (deoxiribonukleinsav)	+	
guanidin	+	
keratin	-	
tesztoszteron	-	40
hasznosítás:		
acetát	+	
malát	+	
oxalát	+	
propionát	+	
piruvát	+	45
savképzés:		
dulcitolból	-	
etanolból	-	
fruktózból	+	50
d-(+)-galaktózból	+	
inulinból	-	
szalicinból	-	
szukrózból	-	
növekedési hőmérséklettartomány	15—37°C	55

A teljes sejt falának hidrolizátumában a diamino-pimelinsav mezo-izomer. A teljes sejt hidrolizátumban arabinóz, galaktóz, mannoz és ribóz cukrok találhatóak. Becker szerint (I. fent) a sejtfal-típus a IV típusba tartozik, a cukorösszetétel szerint A típusú (Lec-Hevalier, I. fent). Az A42125 törzs mikolin-savakat (LCN-A) nem termel. A sejtek Gram-pozitíven festődnek, de a savat nem kötik meg.

Az A42125 törzs tehát a következő meghatározó tulajdonságokkal rendelkezik: IV típusú sejtfal; A típusú cukorösszetétel a teljes sejt hidrolizátumban; mikolinsavak hiánya. Ezek a kemotaxonómiai tulajdonságok, valamint a tenyésztés általános jellemzői az A42125 törzset a *Nocardia Trevisan* 1889 nemzetségbe sorolják [V.B.D. Skerman, V. McGowan és P.H.A. Sneath Eds., „Approved list of bacterial names”, Int. J. Syst. Bacteriol., 30: 225—420 (1980)].

A *Nocardia* fajok között leírásait összehasonlítva az A42125 törzs tulajdonságaival, az alábbi fajokkal mutat hasonlóságot:

Nocardia aerocolonigenes^{a, b}

Nocardia brasiliensis^{a, b}

Nocardia orientalis^{a, b, c}

^a Goodfellow és Schaal (I. fentebb)

^b Gordon, Mishra és Barnett (I. fentebb)

^c Pittenger és Brigham (I. fentebb)

Ezeket a fajokat egy időben tenyésztettük az A42125 törzsszel. A közölt és a kapott adatokat összegyűjtöttük és kiértékeljük.

A hasonlósági mutatót Kurylowicz és munkatársai (W. Kurylowicz, A. Paszkiewicz, W. Woznicka, W. Kurzatowski és T. Szulga, „Numerical taxonomy of Streptomyces”, Polish Medical Publishers, Warsaw, 1975. 37. oldal) alapján számítottuk ki; a következő képlet segítségével:

$$S_{SM} = \frac{Ns^+ + Ns^-}{Ns^+ + Ns^- + Nd} \times 100$$

ahol Ns^+ a pozitív hasonlóságok száma, Ns^- a negatív hasonlóságok száma és Nd az eltérések száma.

Az S_{SM} kiszámításához felhasznált tulajdonságok fiziológiaiak és nem morfológiaiak vagy a tenyésztetre vonatkozóak. A felhasznált tulajdonságok száma 44.

A hasonlósági mutatók:

Mikroorganizmus	S_{SM}
A42125	100
<i>N.aerocolonigenes</i>	88
<i>N.orientalis</i>	70
<i>N.brasiliensis</i>	65

Minthogy a *N.brasiliensis* tenyészet kevés hasonlóságot mutat az A42125 tenyészetével és az S_{SM} értéke is alacsony, elhagytuk az összehasonlításból.

Az *N.orientalis* tenyészet hasonló az A42125 tenyészetéhez. Ez a hasonlóság különösen feltűnő az ISP 3. és 4. táptalajon. Amint azonban az alacsony S_{SM} érték tanúsítja, a fiziológiai tulajdonságokat illetően nem hasonlóak.

A *N.aerocolonigenes*nek nincsenek légihíái, ezért a tenyészetek összehasonlítását csak a növekedést, fonák oldal színét és az oldha-

tó pigmentet illetően tehetjük meg. A *N.aerocolonigenes* első leírásában [E.B.Shirling és D.Gottlieb, „Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* 111”, *Int.J.Syst.Bacteriol.*, 18(4): 279—392 (1968)] az szerepel, hogy az ISP No 5. táptalajon fehér légihíák jelennek meg. Ez a leírás megegyezik a mi összehasonlítási vizsgálatainkkal (l. I. táblázat, ISP No 5.). Az A42125 törzs és a *N.aerocolonigenes* növekedése a fonák oldalának színe elfogadhatóan megegyezik. Ez a megegyezés különösen jól megnyilvánul a Czapek táptalajon és a glükóz-aszparaginos agaron.

5 Gordon (l. fent) a törzset *N.aerocolonigenes*nek határozta meg a légihíákon kívüli tulajdonságok alapján. Az A42125 törzs és a *N.aerocolonigenes* fiziológiai és kemotaxonomiai hasonlóságai messze ellensúlyozzák a légihíák hiányából adódó különbözőségeket. 10 Gordon a *N.orientalis* és a *N.aerocolonigenes* megkülönböztetésére három alapvető tulajdonságot használ fel, amiket a IV. táblázatban tüntettünk fel.

IV. táblázat

A42125 törzs. a *N.aerocolonigenes* és *N.orientalis* megkülönböztető tulajdonságai

tulajdonság	<i>N. orientalis</i>	<i>N. aerocolonigenes</i>	A42125
eritritol	+	-	-
α -metil-glükózid	+	-	+
lizozin rezisztencia	-	+	+

A tárgyalt tulajdonságok szerint az A42125 törzs a *N.aerocolonigenes*hez áll a legközelebb.

Az A42125 törzs és a *N.aerocolonigenes* a szénforráshasznosítást illetően csak egy szénhidrát felhasználást illetően különböznek egymástól (növekedés és savtermelés alapján megállapítva).

Mishra (l. fentebb) *Nocardia* fajokra összeállított meghatározó kulcsát alkalmazva, az A42125 törzs közvetlenül kapcsolatba hozható a *N.aerocolonigenes*-szel. Ezek az összehasonlítások azt mutatják, hogy az A42125 törzs a tenyésztettségét illetően korlátozottan, fiziológiai tulajdonságokra vonatkozólag jól megegyezik a *N.aerocolonigenes* tulajdonságaival. A leglényegesebb különbség az, hogy az A42125 törzsnek vannak légihíái. Minthogy a *N.aerocolonigenes*ről leírták, hogy légihíákat fejleszt, ez a különbség nem olyan nagy ahhoz, hogy az A42125 törzset elkülönítsük ettől a rendszertani egységtől. Ezek szerint az A42125 törzset a *Nocardia aerocolonigenes* (Shinobu és Kawato) Pridham és Lyons 1970 egyik törzsének határoztuk meg. Minthogy a *N.aerocolonigenes* nem szerepel a „Bakteriumnevek elfogadott

jegyzéké”-ben („Approved lists of bacterial names”, l. fent), így nem tekinthető egy ténylegesen közölt fajnak.

45 Hasonlóan más mikroorganizmusokhoz az A42125 antibiotikumot termelő *Nocardia aerocolonigenes* NRRL 18049 is változékony. Ismert módon rekombinánsok, mutánsok és variánsok állíthatók elő vagy különíthetők el. Így például mutánsokhoz juthatunk, ha a mikroorganizmust ismert fizikai és kémiai 50 mutagén hatásoknak — ultraibolya besugárzás, Röntgen besugárzás, gamma besugárzás, N-metil-N'-nitro-N-nitro-guanidin kezelés — tesszük ki. A találmány oltalmi köre kiterjed mindazokra a természetes vagy mesterségesen előállított *Nocardia aerocolonigenes* NRRL 18049 változatokra és mutánsokra, melyek A42125 antibiotikumokat termelnek

60 Számos táptalaj bármelyikét használhatjuk a *Nocardia aerocolonigenes* NRRL 18049 tenyésztésére. Gazdasági szempontokból, az optimális termelés és a termék könnyű elválasztása szempontjából azonban bizonyos táptalajok előnyösebbek. Például a nagyméretű fermentálásoknál a *N.aerocolonigenes* számára előnyös szénhidrátforrás a glükóz és a

dextrin, bár más cukrok, cukor-polimerek, stb. is használhatók.

A *N.aerocolonigenes* előnyös nitrogénforrása a szójaliszt és a kukoricalekvár, de más nitrogénforrás, például desztillációs maradékok, élesztőkivonat, húskivonat, stb. is alkalmazható.

A táptalajban felhasználható szervetlen tápsók a cink-, nátrium-, magnézium-, kalcium-, ammónium-, klorid-, karbonát-, szulfát-, nitrát-, stb. ionokat szolgáltató, vízoldékony sók.

Ugyancsak tartalmazza a táptalaj a mikroorganizmus növekedéséhez és fejlődéséhez szükséges elengedhetetlen nyomelemeket. Ezek a nyomelemek a táptalaj komponenseiben szennyezésként általában a növekedéshez szükséges mennyiségben előfordulnak. A habzás általában nem szokott problémát okozni, de nagyméretű fermentálásnál, ha szükséges, a tenyésztetthez hozzáadhatunk kevés (pl. 0,2 ml/liter) habzásgátlót, például polipropilén-glikolt.

Nagy mennyiségű A42125 antibiotikum előállításához tank-fermentorban végzett, sülyesztett, aerob fermentációt előnyös végezni. Kis mennyiségű A42125 antibiotikumot rázott lombikos tenyészetben is készíthetünk. Amennyiben a nagy fermentort spórákkal oltjuk be, számolni kell a lag-fázissal, ezért előnyösebb vegetatív oltóanyagot használni az oltáshoz. A vegetatív oltóanyag előállításához kis térfogatú táptalajt spórákkal vagy micélium fragmensekkel oltunk be, így friss, aktívan növekvő tenyésztetthez jutunk. Ezt a vegetatív oltóanyagot visszük át a nagy fermentorba. A vegetatív oltóanyag tápközege megegyezik a nagy fermentoréval, de lehet attól eltérő is.

A *Nocardia aerocolonigenes* 25–37°C hőmérséklettartományban termeli az A42125 antibiotikumot. Az antibiotikumtermeléshez optimális hőmérséklet a 30°C.

Amint az a sülyesztett tenyészeteknél szokásos, a fermentor aljáról steril levegőt nyomunk keresztül a táptalajon, miközben lapátos keverővel kevertetünk. Az eddig alkalmazott körülmények között a maximális oxigénfelvétel nem haladja túl a 0,2 mmólt literenként és percenként. Egy terelőkkal ellátott, 115 liter táptalajt tartalmazó, 160 literes fermentornál percenként 200–250 fordulatszámu keverés mellett percenként 0,125 térfogatnyi levegőt kell átvezetni, hogy az oldott oxigén elérje vagy meghaladja a levegőteltelítettség 30%-át.

A fermentálás folyamán vett mintákban az A42125 antibiotikum termelését biológiai értékméréssel határozzuk meg az antibiotikumra érzékeny ismert mikroorganizmus segítségével. Az egyik ilyen teszt-mikroorganizmus segítségével. Az egyik ilyen teszt-mikroorganizmus a *Micrococcus luteus*. A biológiai értékmérésre legalkalmasabb a lyukasztott agarlemez eljárást használni.

Az A42125 antibiotikumot a fermentációs iparban alkalmazott eljárásokkal nyerhetjük ki a tenyészléből. A termelt antibiotikum főként a fermentlé folyékony fázisában található. Az A42125 antibiotikum maximális kinyeréséhez ezért először a fermentlé folyékony fázisát elválasztjuk a micélium tömegétől. A fermentlészűrletet aztán tisztíthatjuk az antibiotikum elválasztása céljából. Erre számos eljárást alkalmazhatunk.

Az A42125 antibiotikum elválasztására előnyös eljárás, hogy a szűrlet kémhatását pH=7-re állítjuk be és alkalmas adszorbenst, például Diaion HP-20 gyantát adunk hozzá. A gyantát szűrővel elválasztjuk és megfelelő oldószerrel, például acetonitril/víz, 1:1 eleggyel extraháljuk. Az extraktumból az oldószert csökkentett nyomáson elpárologva, hozzájutunk az A42125 antibiotikumhoz.

Az így kapott A42125 antibiotikumot ismert módszerekkel tovább tisztíthatjuk. Előnyös eljárás erre az ioncserélő gyantákon végzett kromatografálás.

Az A42125 antibiotikus elválasztást vékonyréteg kromatográfiával követjük nyomon. A szilikagélréteg alkalmas futtató rendszere az acetonitril/metanol/víz/ammónium-hidroxid, 4:2:2:1 összetételű elegy. Ebben a rendszerben az A42125 antibiotikum kb. $R_f=0,43$ értékkel mozdul el. Az antibiotikum kimutatására használhatunk bioautográfiát, például *Micrococcus luteus* használva erre a célra, vagy más módszert például vanilines kén-savas előhívóreagenst.

Eljárhatunk úgy is, hogy A42125 antibiotikumforrásként a fermentlé, micéliumot is tartalmazó szárazanyag tartalmát használjuk fel extrakció és elválasztás nélkül, de előnyösen a víz eltávolítása után. Így például az antibiotikum megtermelése után, a teljes fermentlevet beszárítjuk fagyaszttva szárítással, dobszűrővel vagy azeotropos desztillálással és szárítással. A beszárított fermentlevet közvetlenül hozzákeverjük a takarmány premixhez.

Az A42125 antibiotikum állati és növényi patogén baktériumok növekedését gátolja. Az V. táblázatban összefoglaltuk a különféle baktériumoknál kapott minimális gátlási koncentrációkat (MIC). A MIC értéket a szokásos agar-hígítási vizsgálat határoztuk meg.

V. TÁBLÁZAT

Az A42125 antibakteriális aktivitása

	Vizsgálati mikroorganizmus MIC (mcl/ml)
55	<i>Staphylococcus aureus</i> V1.1 1
	<i>Staphylococcus aureus</i> V41 1
	<i>Staphylococcus aureus</i> X400 1
	<i>Staphylococcus aureus</i> S13E 1
60	<i>Staphylococcus epidermidis</i> Epi 1
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 222 0,5
	<i>Streptococcus pyogenes</i> C203 2
	<i>Streptococcus</i> sp. group D X66 1
	<i>Streptococcus</i> sp. group D 2041 4
65	<i>Haemophilis influenzae</i> 76 8

Az A42125 antibiotikus antimikrobális hatásának egyik fontos jellemzője az anaerob baktériumokkal szembeni MIC értékeket a VI. táblázatban foglaltuk össze. A MIC értékeket ez esetben is az agar-hígítási módszerrel határoztuk meg. A végpontokat 24 órás inkubálás után olvastuk le.

VI. TÁBLÁZAT

Anaerob baktériumok A42125 antibiotikummal szembeni érzékenysége

Anaerob baktériumok	MIC (mcg/ml)
<i>Clostridium difficile</i> 2994	4
<i>Clostridium perfringens</i> 81	4
<i>Clostridium speticum</i> 1128	4
<i>Eubacterium aerofaciens</i> 1235	4
<i>Peptococcus asaccharolyticus</i> 1302	64
<i>Peptococcus prevoti</i> 1281	4
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 1428	8
<i>Peptostreptococcus intermedius</i> 1624	4
<i>Propionibacterium acnes</i> 79	8
<i>Bacteroides fragilis</i> 111	>128
<i>Bacteroides fragilis</i> 1877	>128
<i>Bacteriodes fragilis</i> 1936B	>128
<i>Bacteriodes thetaiotaomicron</i> 1438	128
<i>Bacteroides melaninogenicus</i> 1856/28	64
<i>Bacteroides melaninogenicus</i> 2736	128
<i>Bacteroides vulgatus</i> 1211	128
<i>Bacteroides corrodens</i> 1874	>128
<i>Fusobacterium symbiosum</i> 1470	>128
<i>Fusobacterium necrophorum</i> 6054A	≥0,5

Egy további fontos antimikrobiális tulajdonsága az A42125 antibiotikumnak, hogy gátolja a metánképző baktériumok növekedését. Így például az A42125 antibiotikum milliliterenként 0,1 mcg koncentrációnál gátolja a *Methanococcus vanniellii*-t; a vizsgálatban egy A42125 antibiotikum kristályt helyezünk a minimál táptalajon kinőtt 24 órás egyenletes tenyésztetre, és a gátlást a harmadik napon mértük.

Az A42125 antibiotikum további fontos tulajdonsága, hogy javítja az állatok tápanyaghasznosítását. Így például fokozza a kérődzők tápanyaghasznosítását.

A tápanyaghasznosítást a bendőben történő propionát termeléssel és a propionátok koncentrációjával fejezhetjük ki. A bendőnedvet egy sebészeti úton elhelyezett fisztulán keresztül kaphatunk egy ökréből. Az ökröt az alábbi összetételű, magas rosttartalmú takarmányon tartottuk:

69,95%	durván őrölt kukorica
10%	őrölt kukoricacsutka
8%	szójaliszt (50% protein)
5%	lucernaliszt
5%	melasz
0,6%	karbamid

0,5%	dikálcium-foszfát
0,5%	kálcium-karbonát
0,3%	só
0,07%	A és D ₂ vitamin premix
0,05%	E vitamin premix
0,03%	nyomelem premix

A bendőnedvmintát négyszeres rétegű sajttörítő vásznon szűrjük át, és a szűrletet vákuumedénybe gyűjtjük. A szűrőrétegen viszszamaradt szilárd részecskéket annyi fiziológias pufferben szuszpendáljuk fel, mint amennyi az eredeti térfogata volt, majd a szuszpenziót újra leszűrjük. Az alkalmazott puffer összetétele a következő [Cheng és munkatársai, J.Dairy Sci., 38: 1225 (1955)]:

0,316 g	dinátrium-hidrogén-foszfát
0,152 g	kálium-dihidrogén-foszfát
2,260 g	nátrium-hidrogén-karbonát
0,375 g	kálium-klorid
0,375 g	nátrium-klorid
0,112 g	magnézium-szulfát
0,038 g	kálcium-klorid
0,008 g	vas(II)-szulfát-7-víz
0,004 g	mangán(II)-szulfát
0,004 g	cink-szulfát-7-víz
0,002 g	réz-szulfát-5-víz
0,001 g	kobalt klorid

1 liter vízben oldva.

A két szűrletet választótölcsérbe öntjük és állni hagyjuk, amíg a lebegő részecskék a folyadék tetején össze nem gyűlnek. A tiszta fázist elválasztjuk, ugyanazzal a pufferrel 1:1 arányban hígítjuk, és a kémhatást pH=7 értékre állítjuk be.

40 mg fent ismertetett takarmányra egy 25 milliliteres lombikban rámérünk 10 ml hígított bendőnedvet. Az edénybe bemérünk 5 mg szójabab proteint is. A vizsgálandó vegyületet négy párhuzamosban mérjük be az edényekbe. Ugyancsak beállítunk kétszer négy kontrollédényt is. Az egyik kontroll a nullidős, a másik a tizenhatórás. Valamennyi vizsgálati edényt 38°C hőmérsékleten 16 órán keresztül inkubáljuk. Az inkubációs idő végén megmérjük a kémhatást, és 2 ml 25°C-os metafoszforsavat adunk mindegyik edénybe, a keveréket hagyjuk leülepedni, és a felülúszó illékony zsírsavait gázkromatográfiával elemezzük.

A mintákban az acetát, propionát és a butírat tartalmat határozzuk meg. Az eredményeket statisztikusan hasonlítjuk össze a kontrollok értékeivel. A kezelések közül azokat tekintjük aktívnak, melyeknél a propionát keletkezése lényegesen magasabb, mint a kontrollédényben. A VII. táblázatban összefoglaljuk az A42125 antibiotikummal kezelt edények és a kontrolljaik illékony-zsírsavkoncentrációinak arányait.

VII. táblázat

Az A42125 antibiotikum hatása a kerődzők tápanyaghasznosítására
(öt kísérlet)

dózis mcg/ml	mól% propionat	mól% acetat	mól% butirat	összes zsírsav/kontroll zsírsav: mmól/liter
20	1,283	0,914	0,608	0,921
5	1,237	0,877	1,019	0,988
5	0,959	0,992	1,075	0,921
1	1,122	1,015	0,795	1,237
5	1,118	0,915	0,867	1,041
1	1,105	0,881	1,111	0,997
5	1,778	0,896	0,654	0,921
1	1,458	0,915	0,823	0,858

A metánképzés gátlása ugyancsak hozzájárul a jobb tápanyaghasznosításhoz, mint-hogy az acetát hasznosítható energiává alakul és nem metánná, ami elvész. Ezt az aktivitást in vitro vizsgálatokban mérhetjük, melyek a bendőben lezajló folyamatokat utánozzák. A vizsgálatokat edényekben végzett folyamatos fermentációval végezzük, melyek a bendőben hosszú időtartam alatt lejátszódó folyamatokat modellezik. A légmentesen lezárható edények folyadék- és szilárdanyag-bevezetővel, mintavevő nyílással és gumiballonba vezető gázvezetővel vannak ellátva. A gumiballonban fogjuk fel a fermentáció alatt keletkező gázokat. Az edények folyadéktartalmát 500 ml-en tartjuk egy folyadékgyűjtőedénybe vezető függőleges túlfolyócsővel. Az edényeket 38–40°C hőmérsékleten tartjuk. Mindegyik edényt lassan kevertetjük mágneses keverővel.

A kísérleteket azzal kezdjük, hogy a teszteknél alkalmazott táplálékkal etetett ökrökből a fisztulán át nyert szűrt bendőnedvből 500 ml-t mérünk az egyes edényekbe. Előzetesen 50 ml hígított metafoszforsavat töltünk a kifolyóedénybe, hogy a fermentációs edényből túlfolyó folyadékban ezzel leállítsuk a fermentációt. A fermentációs edényt lezárjuk, és hozzácsatlakoztatjuk a gázgyűjtőballont.

Mindegyik edénybe napi egy liter, alábbi összetételű puffert csepegtetünk folyamatosan:

nátrium-hidrogén-foszfát 2,2 g
magnézium-klorid 0,036 g

nátrium-hidrogén-karbonát 5,9 g
kálium-klorid 0,34 g
nátrium-klorid 0,28 g
karbamid 1,0 g
kálcium-klorid 0,024 g
víz 1 liter
pH=6,8–7,0

40 Mindegyik edénybe naponta kétszer 10 g táplálékot adunk az adagolónyíláson keresztül. Az adagolások után a gázvezetőt elzárjuk és az edényt széndioxiddal kiöblítjük. Naponta összegyűjtjük és analizáljuk az el-folyó folyadékot és az eltávozó gázt.

45 Általában az edényeket négy napig inkubáljuk, mielőtt a vizsgálandó vegyületet hozzáadnánk. Negynapos egyensúly után megkezdjük az elmenő folyadék és gáz analízist, anélkül, hogy hozzáadnánk a kísérleti vegyületet. Az inkubálást addig folytatjuk, amíg az analitikai eredmények viszonylag állandóvá nem válnak. Ekkor megkezdjük a kezelt táplálék adagolását, és a fermentációt a kezelt táplálékkal folytatjuk 7 napon keresztül.

60 A vegyületet olyan mennyiségben adjuk a táplálékhoz, hogy az edényben lévő 500 ml folyadékban a vegyület koncentrációja a VIII. táblázatban megadott értékeket érje el. Legtöbb esetben két párhuzamos vizsgálatot futtatunk, és az egyes fermentációs edényeknél kapott eredményeket átlagoljuk. A VIII. táblázatban összefoglaljuk az A42125 antibiotikum metánképződést gátló aktivitását.

VIII. TÁBLÁZAT

Az A42125 antibiotikum hatása a kérődzők metántermelésére (három kísérlet)

dózis mg/ml	metán; mmól/nap
—	23,0
5	2,3
—	4,1
5	1,8
1	2,3
—	7,2
5	0,3
1	0,8

Egyszeri A32125 antibiotikum adagolásánál megállapított LD₅₀ értékek egerekénél: LD₅₀ (intraperitoneális) = < 9,375 mg/kg LD₅₀ (orális) = 89 mg/kg

Az A42125 antibiotikumnak tipikus pozitív hatása van a propionátok növekedésére és ezáltal a tápanyaghasznosításra, ha naponta és testtömeg-kilogrammonként 0,05–6,75 mg-ot adunk be szájon keresztül a kérődzőknek. Előnyös adag a napenkénti és kilogrammonkénti 0,2–3,5 mg.

Az antibiotikum adagolásának előnyös módja, hogy belekeverjük az állatok takarmányába, de beadhatjuk más formában is, például tablettaként, ivóléként vagy kapszulában. Ezeket a dózizási formákat az állatorvószatban ismert eljárásokkal készítjük el. Az egyes dózisegységek annyi hatóanyagot tartalmaznak, melyek az állatok napi adagjával egyszerű arányban állnak.

A tálmány foglalkozik a fokozott tápanyaghasznosításhoz módosított takarmányösszetétellel, ahol a takarmány tonnánként 6–60 g A42125 antibiotikumot tartalmaz.

Az A42125 antibiotikumot adagolhatjuk az állatoknak szájon keresztül vagy parenterálisan. A legalkalmasabb beviteli mód, ha az A42125 antibiotikumot a táplálékhoz adjuk. Ehhez különféle állapotban lévő táplálékot alkalmazhatunk, lehet a szokásos száraztakarmány, folyékony vagy granulált eleség. Noha a legelőnyösebb az eleséghez történő keverés, más formában is beadhatjuk a hatóanyagot az állatoknak, például tablettá, ivólé alakjában vagy kapszulába zárva. Az egyes adagolási egységek annyi A42125 antibiotikumot tartalmaznak, melyek egyszerű arányban állnak a kezelendő állat napi adagjával.

A takarmányhoz adandó hatóanyag megformálása jól ismert módszerek szerint történik. Előnyös egy koncentrált hatóanyag-premixet alkalmazni. A tipikus premix kilogrammonként 2–400 g antibiotikumot tartalmaz. A premix lehet folyékony vagy szilárd készítmény.

Az eleség végső megformálása a beviteli hatóanyagmennyiségtől függ. Az A42125 antibiotikumot tartalmazó takarmány elkészítéséhez a szokásos eljárásokat — keverés, granulálás — használhatjuk.

12

A parenterális bevitelhez az A42125 antibiotikumot tartalmazó készítményt az állatorvószatban alkalmazott, ismert módszerekkel készíthetjük el. Az A42125 antibiotikumot tartalmazó injektálható készítmény lehet szuszpenzió vagy oldat. Az oldat elkészítésekor az antibiotikumot fiziológiai szempontokból alkalmazható közegben oldjuk. Ez a hordozóközeg megfelelő oldószerből, ha szükséges konzerváló anyagból — például benzilalkohol — és pufferből áll. Alkalmazható oldószer például a víz, az alkoholok, glikolok vagy a közömbös olajok, mint amilyenek a növényi olajok vagy erősen tisztított ásványi olajok.

Az injektálható szuszpenziók hordozóközege valamilyen, a vegyületet nem oldó folyékony anyag és adalékanyagok. Ilyen közeg lehet a víz vagy egy glikol, például polietilén-glikol.

Az adalékanyag valamilyen, fiziológiai szempontból alkalmazható szuszpendáló anyag, mint amilyenek a közeg sűrűségét növelő karboxi-metil-cellulóz, polivinil-pirrolidon, zselatin vagy az alginátok. Sok felületaktív anyag ugyancsak alkalmazható a vegyületek szuszpenzióban tartására. Alkalmazható szuszpendáló anyag a lecitin, alkil-fenol, polietilén-oxid adduktok, naftalin-szulfonsavak, alkil-benzolszulfonátok és a polioxi-etilén-szorbitán-észterek.

Egyedi esetben sok olyan anyag felhasználható az injektálható szuszpenziók elkészítésénél, melyek a folyékony közeg hidrofilitását, sűrűségét és felületi feszültségét befolyásolják. Szuszpendálószerként alkalmazhatunk például szilikon habzásgátlókat, glikolokat, szorbitot és cukrokat.

Az elmondottak szemléltetésére az alábbiakban példákat adunk meg.

1. példa

Az A42125 antibiotikum előállítását végezhetjük rázott lombikos fermentálással vagy tankfermentorban.

A) A rázott lombikos fermentáláshoz az alábbi összetételű ferde agart liofilizált pelletként vagy folyékony nitrogén alatt szuszpenzióként tartott *Nocardia aerocolonigenes* NRRL 18049 kultúrával oltjuk be:

burgonya dextrin	10 g
élesztő kivonat	1 g
enzimmel hidrolizált kazein*	2 g
marhahúskivonat	1 g
kobalt-klorid-6 víz	0,01 g
agar	20 g
ionmentes víz	1 liter

*N-2 Amine A, Humko Sheffield Chemical Co., Lyndhurst, NJ., USA.

A kémhatást nátrium-hidroxid-oldattal pH=6,2–7,0 értékre állítjuk be.

A beoltott agarokat 30°C hőmérsékleten inkubáljuk 7 napon keresztül. A kifejlődött tenyészetet steril eszközzel kaparjuk le, összegyűjtve a spórákat és a micéliumfonadékot.

Az összegyűjtött telepek egynegyedével oltunk be 50 ml alábbi összetételű vegetatív tápközeget:

glükóz	15 g
tápióka dextrin [*]	20 g
szója őrlemény	15 g
kukoricalekvár	10 g
élesztő kivonat	1 g
kalcium-karbonát	2 g
csapvíz	1 liter

^{*}Stadex 11, A.E.Staley Co., Decatur, IL., USA.

Az oldat kémhatását nátrium-hidroxiddal pH=5,5—6,5 értékre állítjuk be.

A beoltott vegetatív táptalajt 250 ml-es Erlenmeyer lombikban inkubáljuk 30°C hőmérsékleten, 5,08 cm kitérésű, 250 percenkénti fordulatszámú körkörös rázógépen, 72 órán keresztül.

1,25 ml vegetatív tenyésztéssel oltunk be 50 ml alábbi összetételű termelő táptalajt:

glükóz	25 g
kukorica keményítő	10 g
oldható húspepton [*]	10 g
enzimmal hidrolizált kazein ^{**}	4 g
melasz	5 g
magnézium-szulfát-7 víz	0,5 g
kalcium-karbonát	2,0 g
Czapek-féle sóoldat ^{***}	2 ml
ionmentes víz	1 liter

^{*}O.M.Peptone, Amber Laboratories, Juneau, Wi., USA.

^{**}N-2 Amine A.

^{***}A Czapek sóoldat az alábbi összetételű: 1 liter ionmentes vízben 100 g kálium-klorid,

100 g magnézium-szulfát-7víz,

2 g vas(II)-szulfát-7víz.

A beoltott termelő táptalajt széles szájú, 250 ml-es Erlenmeyer lombikban rázatjuk 5,08 cm kitérésű körkörös rázógépen 250 percenkénti fordulatszámmal 30°C hőmérsékleten, 5 napon keresztül.

B) A tankfermentáláshoz nagyobb mennyiségű oltóanyagra van szükség ezért 10 ml, az előzőekben ismertetett módon kinövesztett vegetatív tenyésztéssel beoltunk 250 ml második lépcsős növekedési táptalajt, melynek összetétele megegyezik a vegetatív táptalajával. Ezt a második lépcsős tenyésztet kétliteres, széles szájú Erlenmeyer lombikban rázatjuk, 5,08 cm kitérésű körkörös rázógépen 250 percenkénti fordulatszámmal 30°C hőmérsékleten, 70 órán keresztül.

400 ml második lépcsős tenyésztéssel beoltunk 100 liter steril termelő táptalajt, melynek összetétele azonos a rázott lombikos fermentálás termelő táptalajával. A fermentálást 165 literes tankfermentorban végezzük 30°C hőmérsékleten, 3—5 napon keresztül. Lassú levegőárammal — 0,12—0,25 térf./térp/perc — és közepes kevertetéssel — percenként 200—250-es fordulatszám — az oldott oxigén koncentrációját a levegőteltetésiégi érték 30%-ánál tartjuk.

2. példa

Az A42125 antibiotikum kinyeréséhez a teljes — 92 liter — fermentléhez hozzáadunk 3% Hyflo Supercelt és szűrőprezen leszűrjük. A 74 liter szűrlet kémhatását nátrium-hidroxiddal pH=7 értékre állítjuk be. Hozzáadunk 9,4 l Diaion HP-20 gyantát, a keveréket 45 percen keresztül kevertetjük és szűrjük. A szűrletet eldobjuk, a gyantát 3×10 liter vízben és 3×10 liter acetonitril/víz, 3:17 elegyben mossuk szuszpenzálassal és szűrőprezen. A mosólevet eldobjuk. A gyantát acetonitril/víz, 1:1 elegyben szuszpendálva, kevertetve és szűrve, leoldjuk az A42125 antibiotikumot. Egymást követően négy elúciós műveletet végzünk, mindegyik eluátumot megvizsgálva. Papírkorongos tesztel, Micrococcus luteus teszt-organizmust használva. Az első két eluátumot egyesítjük, az acetonitrilt csökkentett nyomáson elpárologtatjuk, és a vízes maradékot fagyaszttva szárítjuk 94,9 g nyers A42125 antibiotikumhoz jutva. A harmadik eluátumból még 20,8 g nyers A42125 antibiotikumot kapunk.

3. példa

A 2. példában leírt módon nyert nyers A42125 preparátumokat egyesítjük, a 115,2 g anyagot 3 liter vízben oldjuk. Az oldatot szűrőprezen eltávolítjuk a csapadékot, és a szűrletet 3 liter Dowax 50×2 (NH⁺ formában lévő 0,075—0,15 mm szemcseméretű gyantából készült oszlopra visszük. Az oszlopot 5 oszloptérfogatnyi vízzel, majd 0,1n ammónium-hidroxiddal mossuk. A 2n ammónium-hidroxiddal végzett elúció legtöbb A42125 antibiotikumot tartalmazó frakcióit egyesítjük és 3 liter térfogatra töményítjük. Az A42125 antibiotikum kicsapódik és szűrőprezen eltávolítjuk. A csapadékot 300 ml metanolban oldjuk, az oldathoz 6 liter étert adva, az A42125 antibiotikumot kicsapjuk. A csapadékot kiszűrve és megszártva 16,6 g A42125 antibiotikumot nyerünk amorf por alakjában. A vízes anyalúgot tovább bepárolva, és a kicsapódó anyagot az előzőek szerint feldolgozva, 20,7 g kevésbé tiszta A42125 antibiotikumhoz jutunk.

A 16,6 g első antibiotikum preparátumot 800 ml meleg vízben oldjuk, az oldatot hagyjuk szobahőmérsékleten állni egy éjszakán át. A kikristályosodó A42125 antibiotikumot szűrőprezen összegyűjtjük, csökkentett nyomáson szárítjuk, 10,6 g és 2,3 g (második generáció) kristályos A42125 antibiotikumhoz jutva.

Op.: 149—150°C.

4. példa

A szarvasmarhák számára módosított, kiegyensúlyozott, magas szemestakarmány tartalmú eleséget az alábbiak szerint állítjuk össze:

kukorica	50,25%
kukoricatorzsa	34,927%

25			26
lucernaliszt, dehidrált, 17%-os	4,00%		-oxid alakjában és 20,00% cinket cink-szulfát alakjában.
szójaliszt, oldózerrel extrahált	4,00%		² 1 kg A-vitamin és D3-vitamin premix 4000000 USP egység A-vitamint és 451500 USP D3-vitamint tartalmaz.
karbamid, takarmány minőségű	0,35%		³ 1 kg E-vitamin premix 40000 UI E-vitamint tartalmaz.
melasz, cukornádból	5,00%		
dikálcium-foszfát	0,65%	5	
NaCl	0,35%		
kálcium-karbonát	0,30%		
nyomelem premix ¹	0,03%		
A-vitamin + D3-vitamin premix ²	0,07%		
E-vitamin premix ³	0,07%	10	
A42125 antibiotikum	0,003%		
¹ A nyomelem premix tartalmaz: 2,50% mangánt mangán(II)-oxid alakjában, 0,07% jódot kálium-jodid alakjában, 0,30% kobaltot kobalt-karbonát alakjában, 0,50% rezet réz-		15	

5. példa

100 mg A42125 antibiotikumot adunk 5 ml vízhez. Az elegyet az alábbi sókat képező savakkal addig savanyítjuk, míg az antibiotikum feloldódik. Ezután az oldatot liofilizálva a kívánt sôt kapjuk. Így az alábbi sókat állítjuk elő:

alkalmazott só	számított pH	képzett só	kitermelés (mg)	Op.: (°C)
2n sósav	2,0	hidroklorid	96	140-145
0,1n sósav	3,6	hidroklorid	91	150-155
0,1n kénsav	1,6 ^x	szulfát	142	220
híg ecetsav	3,5	acetát	80	145-150
híg foszforsav	3,2	foszfát	92	140-145
citromsav	3,5	citrát	80	130-135

^x = 5 ml dioxant adagoltunk az antibiotikum oldására.

SZABADALMI IGÉNYPONT

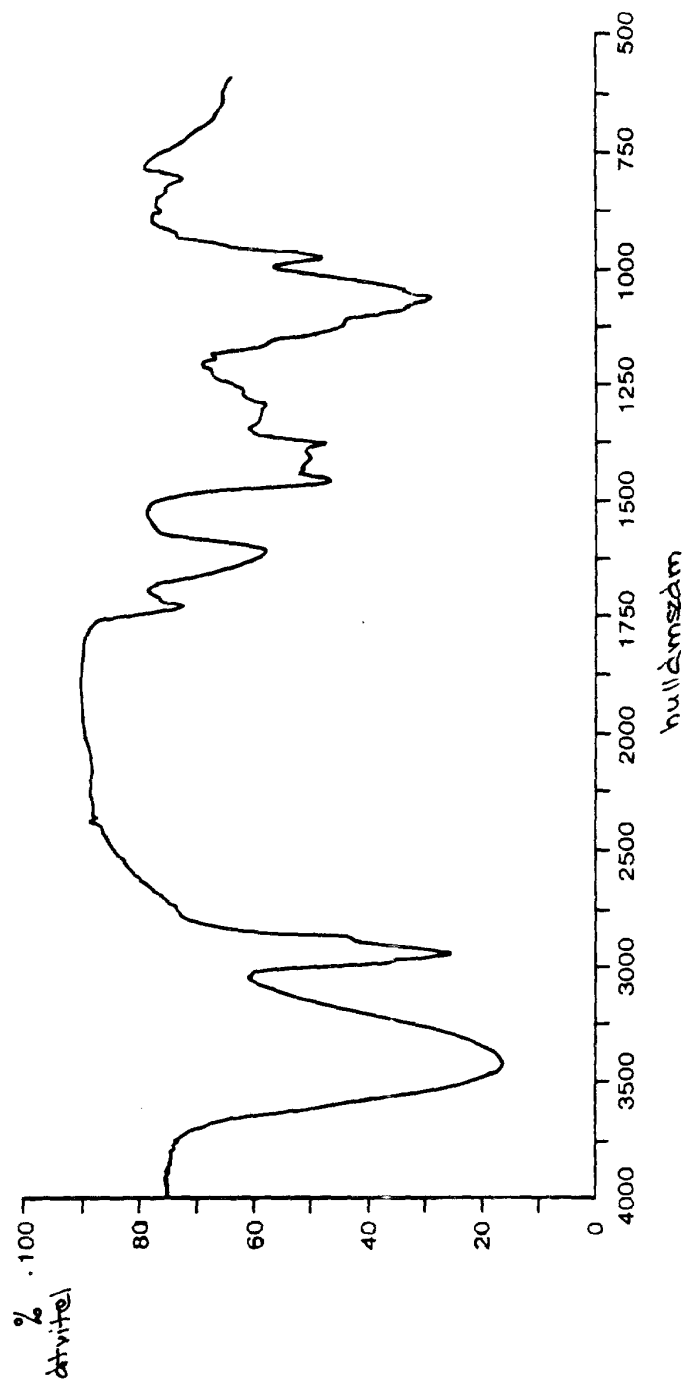
Eljárás az A42125 jelű antibiotikum — mely az alábbi tulajdonságokkal jellemzett: állapot: fehér kristályos anyag (vízből); op.: 149—150°C; UV: nem abszorbeál; IR (KBr): az 1. ábrán látható; titráció (80%-os vizes dimetil-formamid): pK_a 5,2, 8,7 és 10,5; molekulatömeg: 2032 (field deszorpciós tömegspektrometria alapján); tapasztalati képlet: C₁₀₁H₁₈₄N₂O₃₈;

- 35 aminosav: nem található; oldhatóság: vízzoldékony; — és savaddíciós sói előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a *Nocardia aerocolonigenes* NRRL 18049 mikroorganizmust vagy annak A42125 antibiotikumot termelő változatát, vagy mutánsát asszimilálható szénforrást, nitrogénforrást és szervesetlen sókat tartalmazó táptalajon, süllyesztett tenyészetben, aerob körülmények között tenyésztjük, és kívánt esetben a terméket ismert módon kinyerjük a fermentléből, és/vagy kívánt esetben savaddíciós sóvá alakítjuk.
- 40
- 45

1 lap rajz, 1 ábra

197941

Int.Cl₄ C 12 P 1/06; A 61 K 35/74



1. ábra

Kiadja: Országos Találmányi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető

№ 8504. Nyomdaipari vállalat, Ungvár