



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 22.06.73 (P. 185779)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 01.02.75

Opis patentowy opublikowano: 30.11.1977

MKP C12d 9/14

Int. Cl.³ C12D 9/14

CZYTELNIA

Urząd Patentowy
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Danuta Kotiuszko, Halina Morawska, Krystyna Strzeżek, Mieczysław Pikała, Andrzej Rafalski, Kazimierz Czarny, Zygmunt Zaczyński

Uprawniony z patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego,
Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania polifunginy

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania polifunginy, antybiotyku przeciwgrzybowego, przy użyciu mutantu *Streptomyces noursei* var. polifungini ATCC 21581 o zwiększonej zdolności do biosyntetyzowania antybiotyku.

W dotychczas opisanych sposobach wytwarzania polifunginy (opis patentowy nr 71259 oraz opis patentowy nr 81600) stosowano szczep macierzysty (dziki) *Streptomyces noursei* var. polifungini ATCC 21581 lub jego klon.

W opisie patentowym nr 87664 opisany został sposób otrzymywania mutantów *Streptomyces noursei* var. polifungini o wielokrotnie zwiększonej zdolności wytwarzania polifunginy. Stwierdzono, że mutant nr R 851/26/77 tego promieniowca, otrzymany w sposób opisany w w/w opisie patentowym jest szczepem produkcyjnym, różniącym się od szczepu macierzystego wieloma właściwościami. Właściwości te zestawiono w poniższych tabelach 1 i 2.

W biosyntezie makrolidowych antybiotyków polienowych jednostkami budulcowymi pierścienia makrolidowego związków jest octan i propionian. Za kondensację jednostek octanowych odpowiedzialny jest malonylo-CoA, natomiast włączanie jednostki trójwęglowej (propionianu) odbywa się po uprzedniej jego aktywacji do propionylo-CoA i karboksylacji do metylomalonylo-CoA.

Stąd wysokoaktywne mutanty powinny posiadać odpowiednio wysoką czynność enzymów aktywujących octan i propionian oraz wysoką czynność enzymów, odpowiedzialnych za wydajność procesu polimeryzacji. Mutanta produkcyjnego powinna również charakteryzować niska aktywność enzymów odpowiedzialnych za wykorzystanie jednostek

2

budulcowych antybiotyku do innych procesów biochemicznych.

Aktywność enzymatyczna mutantu nr R 851/26/77 odpowiada kryterium biochemicznym dla mutantów o zwiększonej zdolności wytwarzania antybiotyku (Raczyńska — Bojanowska K. — Post. Hig. Med. Dośw. 28/1974/499).

Właściwością mutantu R 851/26/77 jest również brak zdolności wytwarzania aktydionu, co ma wpływ na zwiększenie syntezy polifunginy. Brak zdolności wytwarzania aktydionu, antybiotyku o właściwościach cytostacyjnych, jest istotny również z punktu widzenia ochrony zdrowia pracowników, zatrudnionych przy produkcji polifunginy.

Obecnie stwierdzono, że mutant R 851/26/77 dla wytwarzania wysokich stężeń polifunginy wymaga obecności tłuszczów roślinnych lub zwierzęcych. Według wynalazku jako jedyne źródło węgla w pożywce stosuje się olej sojowy w ilości co najmniej 5% w stosunku do objętości pożywki.

Sposób według wynalazku wyjaśniają poniższe przykłady.

Przykład I. Wytwarzanie polifunginy w skali laboratoryjnej.

1. Hodowla podpowierzchniowa etapu posiewowego. Hodowlę podpowierzchniową etapu posiewowego prowadzi się na pożywce płynnej w kolbach stożkowych o objętości 500 ml, zawierających po 50 ml pożywki o następującym składzie: glukoza czysta — 2%, azotan amonowy czysty — 0,5%, WNK (wyciąg namokowy kukurydzy) 50% suchej masy — 2%, węgiel wapniowy techniczny — 0,5%, woda wodociągowa do 100%. Pożywkę wyjaławia się w auto-

Tablica 1
Aktywność enzymatyczna badanych szczepów

Szczep	Aktywność enzymów			
	Syntetaza cytrynianowa	Dehydrogenaza jabłczanowa	Karboksylotransferaza metylomalonylo-CoA	PEP-karboksylaza
<i>Streptomyces noursei</i> var. polifungini ATCC 21581	wysoka	wysoka	niska	niska
Mutant nr R 851/26/77	niska	niska	wysoka	wysoka

Tablica 2
Wytwarzanie antybiotyków przeciwgrzybowych

Badany szczep	Wytwarzanie aktydionu	Wytwarzanie polifunginy	
		Skala laboratoryjna w jednostkach w 1 ml	Wydajność szarzy (fermentory 150 l) w giga jednostkach
<i>Streptomyces noursei</i> var. polifungini ATCC 21581	Wytwarza	16569—20760	0,95—1,75
Mutant nr R 851/26/77	Nie wytwarza	średnio 64000	średnio 7,0

klawie w ciągu 30 minut w temperaturze 117°C, po ostudzeniu szczepi się zarodnikami mutantu nr R 851/26/77 z hodowli na skosach agarowych z pożywką z wyciągiem ziemniaczanym i glukozą. Hodowlę podpowierzchniową etapu posiewowego prowadzi się na trzęsawce obrotowej o 220 obrotach/minutę, w pomieszczeniu termostatowym o temperaturze 28°C w ciągu 30 godzin.

2. Hodowla podpowierzchniowa etapu produkcyjnego. Hodowlę podpowierzchniową etapu produkcyjnego prowadzi się na pożywce płynnej w kolbach stożkowych o objętości 500 ml, zawierających po 30 ml pożywki o następującym składzie: olej sojowy surowy — 5%, WNK (50% suchej masy) — 1%, drożdże suszone browarnicze — 0,25%, azotan amonowy techniczny — 0,5%, węglan wapniowy — 1%, woda wodociągowa do 100%. Pożywkę wyjaławia się w autoklawie przez 30 minut w temperaturze 117°C, a po ostudzeniu pożywki do każdej kolby dodaje się, w sposób jałowy, materiał posiewowy z hodowli podpowierzchniowej etapu posiewowego w ilości 5% w stosunku do ilości pożywki w kolbie. Hodowlę etapu produkcyjnego prowadzi się na trzęsawce obrotowej o 230 obrotach/minutę w pomieszczeniu termostatowym o temperaturze 30°C w ciągu 120 godzin. Stężenie antybiotyku w końcowej godzinie hodowli wynosiło 64 000 jednostek/ml polifunginy według oznaczeń metodą mikrobiologiczną.

Przykład II. Wytwarzanie polifunginy w fermentorach.

1. Hodowla podpowierzchniowa etapu posiewowego w kolbach. Jako materiał szczepienny dla etapu posiewowego w hodowli podpowierzchniowej w kolbach stosowano zarodniki mutantu produkcyjnego R 851/26/77, postępując jak w przykładzie I. Materiałem z podpowierzchniowej hodowli posiewowej w kolbach szczepiono pożywkę etapu posiewowego w fermentorach.

2. Hodowla podpowierzchniowa etapu posiewowego w fermentorach. W fermentorze o objętości całkowitej 150 l, zaopatrzonym w układ mieszania i napowietrzania, przygotowano pożywkę posiewową. Do fermentora wprowadzono około 90 l wody wodociągowej, a następnie składniki

pożywki: WNK (50% suchej masy) — 2 kg; azotan amonowy techniczny — 0,5 kg; węglan wapniowy techniczny, strącany — 0,5 kg; olej sojowy, surowy, wyjałowiony — 1,5 kg. Po wymieszaniu pożywkę wyjałowiono parą wodną o ciśnieniu 2,5 do 2,8 atm. utrzymującą temperaturę 117°C — 120°C przez 60 minut, po czym ochłodzono i szczepiono materiałem szczepiennym z kolb, wlewając w sposób jałowy do fermentora 1 litr hodowli etapu posiewowego. Hodowlę podpowierzchniową etapu posiewowego w fermentorze prowadzono w ciągu 18—24 godzin, utrzymując temperaturę w granicach 28°C—30°C, podając do fermentora jałowe powietrze w ilości 110 l/min i utrzymując pracę mieszadła na poziomie 300 obrotów/minutę. Brzeczka hodowlana, otrzymana w tak prowadzonym procesie, stanowiła materiał szczepienny dla hodowli podpowierzchniowej etapu produkcyjnego w fermentorze.

3. Hodowla podpowierzchniowa etapu produkcyjnego w fermentorach. Do fermentora o objętości całkowitej 150 l wprowadzono około 90 l wody wodociągowej, a następnie składniki pożywki: drożdże paszowe suszone — 0,4 kg; azotan amonowy techniczny — 0,6 kg; węglan wapniowy techniczny strącany — 1,2 kg; WNK (50% suchej masy) — 1,2 kg; olej sojowy, surowy, niejalo- 50 wy — 6,0 kg. Po wymieszaniu pożywkę wyjałowiono analogicznie, jak w przypadku pożywki posiewowej. Po schłodzeniu do temperatury 28°C—30°C pożywkę etapu produkcyjnego szczepiono 10 litrami hodowli etapu posiewowego.

Hodowlę podpowierzchniową etapu produkcyjnego prowadzono w ciągu 100 godzin w temperaturze 28°C—30°C, podając do fermentora jałowe powietrze w ilości 140—150 l/minutę i utrzymując pracę mieszadła na poziomie 360 obrotów/minutę.

W wyniku tak prowadzonego procesu uzyskano 100 litrów brzeczki, zawierającej średnio 70000 j/ml polifunginy według oznaczeń mikrobiologicznych, co stanowiło 7,0 giga jednostek na 1 szarżę.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania polifunginy przy zastosowaniu mutantów *Streptomyces noursei* var. polifungini ATCC

21581 o zwiększonej zdolności wytwarzania polifunginy, **znamienny tym**, że proces biosyntezy prowadzi się przy użyciu mutantu nr R 851/26/77 w tlenowej hodowli podpowierzchniowej na pożywkach, zawierających przyswajal-

ne źródła azotu oraz olej sojowy jako jedyne źródło węgla, w ilości co najmniej 5%, w czasie potrzebnym do wytwarzania maksymalnej ilości antybiotyku, który izoluje się znanymi sposobami.