



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 05.11.74 (P. 175337)

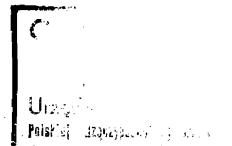
Pierwszeństwo: 26.11.73 Niemiecka
Republika
Demokratyczna

Zgłoszenie ogłoszono: 03.11.75

Opis patentowy opublikowano: 31.12.1977

MKP C12d 13/10

**Int. Cl.²
C12D 13/10**



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: VEB Arzneimittelwerk Dresden, Radebeul
(Niemiecka Republika Demokratyczna)

**Sposób fermentacyjnego otrzymywania produktów
przemiany materii streptokoków, zwłaszcza streptokinazy**

1

Wynalazek dotyczy biologicznego sposobu hodowli streptokoków, w celu wytworzenia produktów przemiany materii streptokoków, zwłaszcza streptokinazy.

Streptokinaza jako produkt przemiany materii β -hemolizujących streptokoków i w postaci o wysokiej czystości, nie zawierająca substancji gorączkotwórczych, jest bardzo poszukiwanym lekiem, znajdującym zastosowanie głównie w przypadku wczesnego zawału mięśnia sercowego, ostrego zamknięcia tętnic kończyn, wczesnej zakrzepicy żył i zatoru płuc i tak dalej.

Znane są liczne sposoby biologicznego otrzymywania streptokinazy i streptodornazy w wyniku fermentacji hemolizujących streptokoków, które charakteryzują się jednak bardzo skomplikowanymi i dlatego kosztownymi roztworami pożywek i stosunkowo niewielkimi wydajnościami. Przykładowo według opisu patentowego Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3 046 200, stosując pożywkę na bazie enzymatycznie zhydrolizowanej kazeiny i szeregu aminokwasów oraz witamin, jak również soli, otrzymuje się tylko 3500 do 3530 j. streptokinazy na ml roztworu kultury. Również opisy patentowe Wielkiej Brytanii nr 923 453 i 924 562 stosują skomplikowaną pożywkę, zawierającą następujące składniki: zhydrolizowaną kazeinę, KH_2PO_4 , cystynę, glicynę, dekstrozę, uracyl, siarczan adeniny, kwas nikotynowy, pirydoksynę, tryptofan, pantotenian wapnia, tiaminę, ryboflawinę, kwas tiogliko-

2

lowy, jak również roztwór soli z pierwiastkami śladowymi. Lecz również w tym przypadku uzyskano tylko około 1170 do 2200 j. streptokinazy na ml roztworu kultury.

Celem wynalazku było znalezienie takiego sposobu fermentacyjnego otrzymywania streptokinazy, który pozwala na wytwarzanie streptokinazy za pomocą prostych i tanich pożywek i z wysokimi wydajnościami.

Nieoczekiwanie stwierdzono, że stosowanie tego rodzaju skomplikowanych i kosztownych pożywek nie jest konieczne, i że otrzymuje się znacznie większe wydajności streptokinazy, stosując obok znanych składników pożywki, jak sole i cukier, jako źródło azotu autolizat i/albo namok kukurydzy. Stosowany według wynalazku autolizat drożdży, ewentualnie namok kukurydzy może zawierać 0,1—0,8%, korzystnie 0,2—0,4% azotu w stosunku do roztworu pożywki.

Zaletami wynalazku są: prostsza i tańsza pożywka i 3-4-krotnie wyższa biologiczna wydajność streptokinazy.

W poniższych przykładach opisane zostały 2 stopnie kultury wstępnej szczepu streptokoków, jak również kultura główna. Można jednak zastosować wynalazek także w kombinacji z roztworami innych kultur ewentualnie technikami kulturowymi, odnoszącymi się do streptokinazy.

Przykład I. 1 i 2 stopień hodowli wstępnej. Pożywkę składającą się z 20 g/litr trzustkowego

peptonu z mięsa lub ryby, 5 g/litr soli kuchennej, 2% surowicy bydlęcej, albo autolizatu drożdży o zawartości azotu równej 0,2% w odniesieniu do roztworu pożywki umieszcza się w kolbie Erlenmayera o pojemności 200 ml, sterylizuje się i zaszczepia 10 ml zawiesiny streptokoków grupy C (*Streptococcus equisimilis*) w fizjologicznym roztworze soli kuchennej. Po okresie wylegania, trwającym 16 godzin w temperaturze 37°C, przeszczepia się po 20 ml tej 1. hodowli wstępnej do mieszaników, zawierających 2000 ml pożywki (2. hodowli wstępnej), albo używa się jej jako szczepionki dla hodowli głównej. Pożywka składa się z autolizatu drożdży o zawartości azotu 0,2% w odniesieniu do pożywki, jak również z pospolitych soli (KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , CH_3COONa , Na_2HCO_3 , MgSO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, MnCl_2). Hodowla jest prowadzona najkrócej do początku, najdłużej do końca, korzystnie od połowy logarytmicznej fazy wzrostu (około 18 godzin) do temperatury 28°C. Przy stosowaniu temperatury 37°C proces trwa tylko około 7 godzin.

Ta 2. hodowla wstępna najlepiej nadaje się na materiał do zaszczepienia dla następującej hodowli głównej, ponieważ streptokoki znajdują się w najaktywniejszej fazie rozmnożenia i mogą natychmiast kontynuować wzrost.

Przykład II. Hodowla główna. Roztwór pożywki kultury głównej składa się z:

autolizatu drożdży 15–120 g/litr roztworu pożywki, co odpowiada 0,1–0,8%, korzystnie 0,2–0,4% zawartości azotu w roztworze pożywki.

KH_2PO_4	2,50 g/litr roztworu pożywki
K_2HPO_4	2,50 g/litr roztworu pożywki
$\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1,00 g/litr roztworu pożywki chem. cz.
NaHCO_3	1,00 g/litr roztworu pożywki
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,40 g/litr roztworu pożywki
$\text{FeSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,02 g/litr roztworu pożywki
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/litr roztworu pożywki
glukoza	10,00 g/litr roztworu pożywki

Sterylicację roztworu soli i autolizatu drożdży można prowadzić osobno lub razem w formie jednolitego roztworu. Na końcu dodaje się sterylizowany roztwór glukozy. Autolizat drożdży można saczyć w warunkach sterylnych.

Po napełnieniu naczynia fermentacyjnego następuje zaszczepienie w stosunku ilościowym 1/100 części objętościowych 1. lub 2. hodowli wstępnej do roztworu pożywki. Wiek 2. kultury wstępnej

(kultury poddawanej mieszanii) nie powinien (w zależności od temperatury) leżeć poza logarytmiczną fazą wzrostu.

Proces przeprowadza się w temperaturze 28°C, stosując mieszanie o ilości obrotów 100–300 min⁻¹. Wartość pH utrzymuje się automatycznie w granicach 7,2–7,4.

Czas trwania procesu wynosi 20–24 godziny przy zaszczepieniu kulturą, poddawaną mieszanii, a 24–28 godzin przy zaszczepieniu kulturą stojącą. W temperaturze 35°C czas trwania procesu skraca się od 12–16 godzin.

Wydajności streptokinazy wynoszą przy zaszczepieniu kulturą poddawaną mieszanii do 14000 j/ml roztworu kultury w temperaturze 28°C.

Przykład III. Wstępną hodowlę materiału do zaszczepiania prowadzi się, jak w przykładzie I. W roztworze pożywki kultury głównej stosuje się jako źródło azotu namok kukurydziany w ilości 35–280 ml/litr roztworu pożywki, co odpowiada zawartości azotu 0,1–0,8%, korzystnie 0,2–0,4% w roztworze pożywki. Roztwór soli jest taki sam, jak w przykładzie II. Po takim nastawieniu wartości pH, jak w przykładzie II, otrzymuje się wydajność około 4500 j/ml przy zaszczepieniu kulturą stojącą i 8000 j/ml roztworu kultury przy zaszczepieniu kulturą, poddawaną mieszanii.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób fermentacyjnego otrzymywania produktów przemiany materii streptokoków, zwłaszcza streptokinazy, **znamienny tym**, że jako źródło azotu w roztworach pożywek stosuje się autolizat drożdży i/lub namok kukurydziany.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w hodowli głównej oraz w pierwszej i drugiej hodowli wstępnej, jako źródło azotu stosuje się wyłącznie autolizat drożdży albo namok kukurydziany.

3. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że jako źródło azotu stosuje się autolizat drożdży albo namok kukurydziany o zawartości azotu 0,1–0,8%, korzystnie 0,2–0,4% w odniesieniu do roztworu pożywki.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że autolizat drożdży i namok kukurydziany stosuje się w mieszaninie.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że autolizat drożdży albo namok kukurydziany dodaje się do innych, znanych pożywek, stosowanych przy otrzymywaniu streptokinazy.