

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

79 336

Patent dodatkowy
do patentu _____

MKP C12d 9/20

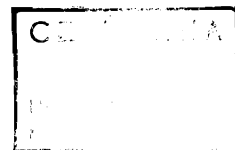
Zgłoszono: 19.03.1973 (P. 161365)

Pierwszeństwo: _____

Int. Cl.² C12D 9/20

Zgłoszenie ogłoszono: 01.03.1974

Opis patentowy opublikowano: 15.09.1976



Twórcy wynalazku: Marian Tyc, Teodora Kadzikiewicz, Leonard Karabin,
Józef Wyrzuc, Krystyna Taflirska, Danuta Michalak,
Cecylia Komorowska

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

Sposób wytwarzania bacytracyny

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania bacytracyny na drodze fermentacji głębinowej.

Bacytracyna jest antybiotykiem wytwarzanym przez tlenowe laseczki przetrwalnikujące, należące do rodzaju *Bacillus*. Antybiotyk ten nie jest związkiem jednorodnym, lecz jest mieszaniną polipeptydów o podobnej budowie chemicznej. Po raz pierwszy został opisany w 1945 r w *Science* 102 376 (1945) przez Johnson, Ankera i Meleneya. Bacytracyna wywiera hamujące działanie przede wszystkim na drobnoustroje Gram-dodatnie nie działa na drobnoustroje Gram-ujemne z wyjątkiem *Neisseria gonorrhoeae* i *Neisseria meningitidis*.

Bacytracyna znalazła niewielkie zastosowanie w medycynie ludzkiej i weterynaryjnej, przede wszystkim w leczeniu miejscowym. Szerokie natomiast zastosowanie antybiotyk ten znalazł w żywieniu zwierząt jako dodatek do pasz. Mała ilość bacytracyny dodana do paszy dla drobiu, trzody chlewnej i rogacizny zwiększa wydatnie szybkość przyrostu wagi zwierząt i powoduje lepsze wykorzystanie paszy przez organizm zwierzęcy.

Znane są sposoby wytwarzania bacytracyny przy użyciu szczepów *Bacillus subtilis* i *Bacillus licheniformis*, wytwarzających w pożywkach produkcyjnych dużą liczbę przetrwalników (endospor). Przetrwalniki bakteryjne odznaczają się wyjątkową opornością na czynniki fizyko-chemiczne. Są one najbardziej wytrzymałymi na podwyższoną temperaturę układami żywymi, znoszącymi temperatury powyżej 100°C. W przypadku wytwarzania paszowych preparatów bacytracyny, które otrzymuje się przez suszenie całej objętości hodowli w suszarce rozpyłowej, znaczna część żywych przetrwalników pozostaje w preparatach antybiotyku. Zastosowanie w procesie suszenia temperatur powodujących zabicie form ciepłoopornych szczepu produkcyjnego jest niewskazane ze względu na termolabilność biologicznie czynnej substancji. Wynika stąd potrzeba stosowania dodatkowych kosztownych operacji takich, jak naświetlanie promieniami γ , celem zabicia dużej liczby form przetrwalnych szczepu produkcyjnego, występujących w przygotowywanym preparacie paszowym.

Produkcja bacytracyny przy użyciu obecnie stosowanych szczepów stwarza warunki do zwiększenia w pomieszczeniach zakładu produkcyjnego zawartości przetrwalników bakteryjnych, które są głównym i potencjalnym źródłem przypadkowych zakażeń w przemyśle, opartym na biosyntezie. Omawiane zagadnienie nabiera szczególnego znaczenia w przypadku zakładów produkcyjnych, prowadzących równolegle kilka procesów mikro-

biologicznych. Częstość bowiem przypadkowych zakażeń zależy w dużym stopniu od liczby przetrwalników bakteryjnych, znajdujących się w pomieszczeniach produkcyjnych. Z reguły pożywki produkcyjne i hodowle produkcyjne, zakażone obcą mikroflorą, wykazują niskie aktywności i nie nadają się do dalszego przerobu, co powoduje duże straty finansowe.

Sposobem według wynalazku usuwa się powyższe wady przez zastosowanie do produkcji bacytracyny szczepów o upośledzonej zdolności sporulacji.

Według piśmiennictwa naukowego biosynteza bacytracyny występuje po zakończeniu fazy logarytmicznej wzrostu drobnoustroju, i jest ściśle związana z procesem sporulacji (R.W. Bernlohr, G.D. Novelli: Arch. Biochem. Biophys. (1960) 87 232; R.W. Bernlohr G.D. Novelli: Arch. Biochem. Biophys., (1963), 103 9; G. Balassa, H. Ionesco, P. Schaeffer: Compt. Rend. (1963), 257, 986).

Obecnie stwierdzono, że bacytracynę można wytwarzać przy użyciu mutantów niezdolnych do tworzenia endospor, czyli mutantów asporogennych, lub mutantów oligosporogennych o wybitnie ograniczonej zdolności sporulacji. Celem otrzymania takich szczepów poddaje się komórki drobnoustrojów, wytwarzających bacytracynę, działaniu znanych czynników mutagennych fizycznych i chemicznych.

W hodowlach mutantów asporogennych z reguły nie stwierdza się w ogóle form ciepłoopornych. Pojawienie się w takich hodowlach małej liczby przetrwalników jest związane z rzadko występującym zjawiskiem mutacji powrotnej. Wśród mutantów oligosporogennych, charakteryzujących się zmniejszoną zdolnością sporulacji, spotyka się takie, które wytwarzają w 1 ml hodowli 10 lub nawet 100 000 000 razy mniej form ciepłoopornych w porównaniu ze szczepem wyjściowym. Częstość tworzenia endospor u każdego mutantu oligosporogennego jest cechą stałą, która przekazywana jest komórkom potomnym.

Paszowe preparaty bacytracyny otrzymywane w hodowli mutantów asporogennych i szczepów o wybitnie upośledzonej zdolności sporulacji praktycznie nie zawierają form ciepłoopornych szczepu produkcyjnego. Należy nadmienić, że w preparatach paszowych zazwyczaj wykrywa się małą liczbę drobnoustrojów, ponieważ niektóre etapy produkcyjne, np. suszenie hodowli w suszarce rozpyłowej, przeprowadza się w warunkach niejałowych.

Szczepy stosowane do wytwarzania bacytracyny sposobem według wynalazku wykazują istotne różnice morfologiczne, hodowlane i fizjologiczne w odniesieniu do szczepów wyjściowych. Występujące różnice między omawianymi szczepami wynikają z tabel 1, 2 i 3. Różnice te dotyczą zdolności tworzenia endospor, redukcji azotanów do azotynów, koagulacji i peptonizacji mleka, typu i intensywności wzrostu na różnych podłożach, upłynnienia żelatyny oraz wytwarzania kwasu z węglowodanów i alkoholi. Wykazane różnice są tak znamienne, że z punktu widzenia zasad obecnej taksonomii bakterii, bez uwzględnienia kryteriów ekologicznych, otrzymane przez nas szczepy możnaby uznać nie tylko za nowe gatunki, ale nawet za odrębną grupę taksonomiczną.

Dodatkową zaletą otrzymywanych szczepów o upośledzonej zdolności sporulacji jest wytwarzanie dużych ilości bacytracyny na prostych i tanich pożywkach. Otrzymane przez nas mutanty wykazują w hodowli na trzęsawce obrotowej aktywność rzędu 400 j/ml (około 8000 mcg/ml) bacytracyny. Aktywność ta jest znacznie wyższa w porównaniu z aktywnościami (325 j/ml) notowanymi np. w opisie patentowym St. Zjedn. Ameryki 2.828.246.

Hodowle mutantów asporogennych i oligosporogennych, wykazujące wysokie stężenia bacytracyny, są dogodnym materiałem wyjściowym nie tylko do otrzymywania preparatów bacytracyny dla celów paszowych, lecz również preparatów bacytracyny dla celów leczniczych.

Szczepy o upośledzonej zdolności sporulacji wykazują stabilność pod względem cechy wytwarzania bacytracyny. Kilkakrotne pasażowanie na podłożu agarowym i przechowywanie hodowli agarowej w ciągu kilku tygodni w temperaturze 2–4°C, jak również przechowywanie szczepów w postaci zliofilizowanej, nie wpływało na obniżenie aktywności antybiotycznej. Omawiane szczepy można liofilizować w następujących zawieszalnikach: 20% inaktywowana surowica końska, mleko odtłuszczone i roztwór, zawierający 10% sacharozy i 1% żelatyny.

Szczepy o upośledzonej zdolności sporulacji można rozmnażać na podłożu agarowym, zawierającym różne źródła azotu (pepton, wyciąg mięsny, wyciąg słodowy i inne wyciągi roślinne i zwierzęce). Źródłem węgla mogą być cukry proste lub wielocukry. Ponadto agarowe podłoże może zawierać dodatki soli mineralnych i soli kwasów organicznych oraz mikroelementy.

Sposobem według wynalazku proces biosyntezy bacytracyny prowadzi się przy użyciu szczepów z rodzaju *Bacillus* niezdolnych do tworzenia endospor lub szczepów o wybitnie ograniczonej zdolności sporulacji, w temperaturze poniżej 42°C, korzystnie w temperaturze 33–35°C, na odpowiednich pożywkach zawierających przyswajalne źródła azotu i węgla pochodzenia roślinnego i/lub zwierzęcego oraz sole mineralne i sole kwasów organicznych, przy równoczesnym mieszaniu i napowietrzaniu w czasie potrzebnym do wytworzenia antybiotyku w hodowli, z której otrzymuje się znanymi metodami preparaty bacytracyny dla celów paszowych i leczniczych.

W pożywkach płynnych jako źródło azotu stosuje się odtłuszczoną mąkę sojową, wyciągi i hydrolizaty z mąki sojowej, mąkę z nasion słonecznikowych, mąkę z orzeszków ziemnych, mąkę rybną, drożdże, wyciąg drożdżowy, wyciąg namokowy kukurydzy i/lub siarczan amonowy i azotany.

Jako źródło węgla stosuje się korzystnie rozpuszczalne i nierozpuszczalne węglowodany, np. glukozę techniczną, sacharozę i inne cukry proste lub ich mieszaniny, skrobię, mąkę ziemniaczaną, mąkę kukurydzianą lub ich mieszaniny z wymienionymi uprzednio cukrami prostymi.

Ponadto pożywki produkcyjne wzbogaca się różnymi solami mineralnymi i solami kwasów organicznych takich, jak kwas mlekowy, kwas glukonowy, lub kwas octowy, oraz mikroelementami.

Wyjściowym materiałem szczepiennym dla pożywek płynnych są hodowle na agarze skośnym lub liofilizaty szczepów. Proces wytwarzania bacytracyny prowadzi się na płynnych pożywkach w temperaturze poniżej 42°C przy równoczesnym mieszaniu i napowietrzaniu w aparaturze powszechnie stosowanej w przemyśle fermentacyjnym.

Przykład I. Fermentację prowadzi się w trzech stadiach.

Stadium posiewowe I. Kolby Erlenmeyera o pojemności 500 ml, zawierające 30 ml pożywki posiewowej nr 1 lub nr 2 o składzie niżej podanym:

Pożywka posiewowa nr 1

Mąka sojowa odtłuszczona	2,0%
Mąka ziemniaczana	1,5%
CaCO ₃	0,5%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2%
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,3%
MnSO ₄ · 5 H ₂ O	0,01%
Woda wodociągowa do	100%

Sterylizacja: 117°C w ciągu 25 minut. Po sterylizacji wartość pH wynosiła 6,7.

Pożywka posiewowa nr 2

Mąka sojowa odtłuszczona	2,0%
Drożdże browarnicze(suszone)	0,2%
Mąka ziemniaczana	1,5%
CaCO ₃	0,5%
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,33%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2%
MnSO ₄ · 5 H ₂ O	0,01%
Woda wodociągowa do	100%

Sterylizacja, jak wyżej. Po sterylizacji wartość pH wynosiła 6,8.

Zaszczepiono komórkami szczepu o upośledzonej zdolności sporulacji, zebranych oczkiem, czy z dwudniowej hodowli na agarze skośnym i wstawiono na trzęsawkę obrotową o 240 obr/min. Inkubowano 24 godziny w temperaturze 33°C. Otrzymana hodowla służyła jako inoculum dla stadium II.

Stadium posiewowe II. Do kolb Erlenmeyera o pojemności 500 ml, zawierających po 30 ml pożywki posiewowej nr 1 lub nr 2, dodano po 0,2 ml hodowli stadium I. Inkubowano w temperaturze 33°C na trzęsawce obrotowej o 240 obr/min w ciągu 18 godzin.

Stadium produkcyjne. Do kolb Erlenmeyera o pojemności 500 ml, zawierających 30 ml pożywki produkcyjnej o składzie niżej podanym:

Pożywka produkcyjna

Mąka sojowa odtłuszczona	4,5%
Mąka ziemniaczana	2,0%
Kwas mlekowy spożywczy	1,2%
CaCO ₃	0,4%
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1%
MnSO ₄ · 5 H ₂ O	0,01%
KH ₂ PO ₄	0,01%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2%
Woda wodociągowa do	100%

(Sterylizacja: 117°C w ciągu 30 minut. Po sterylizacji wartość pH wynosiła 6,7).

— dodano hodowlę stadium II w ilości 1% w stosunku do objętości pożywki.

Fermentację prowadzono w temperaturze 33°C na trzęsawce obrotowej o 240 obr/min. Po zakończeniu fermentacji, co nastąpiło po upływie 38 godzin, płyny fermentacyjne wykazywały aktywność 408 j/ml.

Przykład II. Stadium I. Kolby Erlenmeyera o pojemności 500 ml, zawierające po 30 ml pożywki posiewowej nr 1 lub nr 2, zaszczepiono zliofilizowaną zawiesiną szczepu (przed liofilizacją: 0,2 ml zawiesiny zawierającej 10^8 komórek (ml)) i inkubowano w temperaturze 33°C w ciągu 24 godzin. Otrzymaną hodowlę użyto jako inoculum do stadium posiewowego II.

Hodowle stadium II i stadium produkcyjnego przeprowadzono w sposób podany w przykładzie I. Po 37 godzinach fermentacji aktywność płynów fermentacyjnych wynosiła 384 j/ml bacytracyny.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania bacytracyny na drodze fermentacji głębinowej przy użyciu szczepów z rodzaju *Bacillus*, znamienny tym, że proces biosyntezy prowadzi się przy użyciu szczepów, niezdolnych do tworzenia endospor lub o wybitnie ograniczonej zdolności sporulacji, w temperaturze poniżej 42°C , korzystnie w temperaturze $33\text{--}35^{\circ}\text{C}$, na płynnych pożywkach, zawierających przyswajalne źródła azotu i węgla pochodzenia roślinnego i/lub zwierzęcego oraz sole mineralne i sole kwasów organicznych, przy równoczesnym mieszaniu i napowietrzaniu w czasie potrzebnym do wytworzenia antybiotyku w hodowli, z której otrzymuje się znanymi metodami produkt dla celów paszowych i leczniczych.

Tabela 1

Porównanie właściwości wyjściowego szczepu *Bacillus licheniformis* i pochodnego mutantu U3-3'/93

Podłoże	Cecha	<i>Bacillus licheniformis</i>	Mutant U3-3'/93
1	2	3	4
	Kształt	Laseczki występujące pojedynczo, w parach lub krótkich łańcuszkach. Końce komórek zaokrąglone	Laseczki występujące pojedynczo, w parach lub krótkich łańcuszkach. Końce komórek zaokrąglone
	Barwienie	Gramo-dodatnie	Gramo-dodatnie
	Endospory	wytwarza elipsoidalne endospory, ułożone centralnie lub paracentalnie	nie wytwarza
Bulion zwykły	typ wzrostu	rośnie w postaci kożuszka na powierzchni bulionu	wzrost dyfuzyjny
Bulion zawierający 7% NaCl	wzrost	rośnie w postaci kożuszka na powierzchni bulionu	wzrost dyfuzyjny
Bulion z glukozą	wzrost w warunkach beztlenowych	dobry	nieznaczny
Agar z glukozą	wzrost	obfity, pomarszczony, o zabarwieniu beżowym	słaby przeźroczysty
Agar sojowy	wzrost	obfity, o zabarwieniu beżowym	słaby przeźroczysty
Agar Simmons	wzrost	wykorzystuje	+
z cytrynianem	wykorzystywanie cytrynianu	(+++)	-
Woda peptonowa	wzrost	rośnie w postaci kożuszka	wzrost dyfuzyjny
	wytwarzanie indolu	nie wytwarza	nie wytwarza
Mleko	koagulacja i peptonizacja	koaguluje i peptonizuje	nie koaguluje i nie peptonizuje
Stupek żelatynowy	upłynnianie	upłynnia	nie upłynnia
Podłoże azotowe	redukcja	redukuje	redukuje
Podłoże Voges-Proskauera	$\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$ wytwarzanie acetoiny	wytwarza	+
			-

Objaśnienie: + = wątpliwe
 - =

Tabela 2

Porównanie właściwości wyjściowego szczepu *Bacillus subtilis* i dwóch pochodnych mutantów

Podłoże	Cecha	<i>Bacillus subtilis</i>	Mutant Ip 120'/42	Mutant NG 120'/69
1	2	3	4	5
	Kształt	laseczki występujące pojedynczo, w parach, lub krótkich łańcuskach. Końce komórek zaokrąglone	laseczki występujące pojedynczo, w parach lub krótkich łańcuskach. Końce komórek zaokrąglone	laseczki występujące pojedynczo, w parach lub krótkich łańcuskach. Końce komórek zaokrąglone
	Barwienie Endospory	Gramo-dodatnie wytwarza elipsoidalne endospory, ułożone centralnie lub paracentralnie	Gramo-dodatnie endospory elipsoidalne, ułożone centralnie lub paracentralnie. Wytwarza około 20000000 razy mniej w porównaniu ze szczepem wyjściowym	nie wytwarza
Bulion zwykły	wzrost	rośnie w postaci kożuszka na powierzchni bulionu	wzrost dyfuzyjny	wzrost dyfuzyjny
Bulion zawierający 7% NaCl	wzrost	kożuszka na powierzchni bulionu	rośnie w postaci wzrost dyfuzyjny	wzrost dyfuzyjny
Bulion z glukozą	wzrost w warunkach beztlenowych	nieznaczny	dość dobry	nie rośnie
Agar z glukozą	wzrost	obfity, pomarszczony, o zabarwieniu beżowym	dość dobry, bezbarwny	słaby, przeźroczysty
Agar sojowy	wzrost	obfity, o zabarwieniu beżowym	dość dobry, przeźroczysty	słaby, przeźroczysty
Agar Simmonsa z cytrynianem	wykorzystywanie cytrynianu	wykorzystuje	wykorzystuje	wykorzystuje
Woda peptonowa	wzrost	rośnie w postaci kożucha	wzrost dyfuzyjny	wzrost dyfuzyjny
	wytwarzanie indolu	nie-wytwarza	nie wytwarza	nie wytwarza
Mleko	koagulacja i peptonizacja	koaguluje i peptonizuje	nie koaguluje i niepeptonizuje	nie koaguluje i nie peptonizuje
Słupek żelatynowy	upłynnianie	upłynnia	upłynnia	nie upłynnia
Podłoże azotowe	redukcja $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$	redukuje	nie redukuje	redukuje
Podłoże Voges-Proskauera	wytwarzanie acetoiny	wytwarza	wytwarza	wytwarza

T a b e l a 3

Wytwarzanie gazu i kwasu z węglowodanów i alkoholi przez badane szczepy

Węglowodan lub alkohol	Bacillus subtilis	Bacillus licheni- formis	Mutant Ip 120'/42	Mutant NG 120'/69	Mutant U3-3'/93
kwas	+	+	+	+	-
Arabinoza					
gaz	-	-	-	-	-
kwas	++	++	++	++	++
Glukoza					
gaz	-	-	-	-	-
kwas	-	-	-	-	-
Laktoza					
gaz	-	-	-	-	-
kwas	±	±	±	±	±
Mannitol					
gaz	-	-	-	-	-
kwas	-	-	-	-	-
Ksyloza					
gaz	-	-	-	-	-
kwas	++	++	++	++	++
Sacharoza					
gaz	-	-	-	-	-
kwas	-	-	-	-	-
Sorbitol					
gaz	-	-	-	-	-
kwas	-	-	-	-	-
Ramnoza					
gaz	-	-	-	-	-

Objaśnienie: Znak + oznacza intensywność wytwarzania
znak - oznacza brak wytwarzania