



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 05.07.76 (P. 190962)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 13.02.78

Opis patentowy opublikowano: 15.05.1980

Int. Cl.² C12D 9/14

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Edward Żukowski, Anna Sokół, Jan Żebrowski,
Maria Dutkiewicz, Andrzej Korona, Jerzy Luba,
Zbigniew Lassota, Andrzej Dalewski, Danuta Kuwał,
Jan Ruszczyński, Marek Fabijański, Henryk Zalewski,
Tadeusz Kościeszka

Uprawniony z patentu: Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”,
Warszawa (Polska)

Sposób otrzymywania ryfamycyny B

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania ryfamycyny B na drodze hodowli szczepu *Streptomyces mediterranei*.

Z opisów patentowych Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 3150046 i nr 2988490 oraz opisu patentowego nr 82636 znane są sposoby otrzymywania ryfamycyny B na drodze hodowli szczepu *Streptomyces mediterranei* na pożywkach posiewowych, zawierających przyswajalne źródła węgla, azotu oraz sole mineralne i szczepieniu utrzymanym materiałem posiewowym pożywek produkcyjnych, zawierających przyswajalne źródła węgla, azotu, sole mineralne oraz inhibitory tworzenia innych ryfamycyn.

Proces biosyntezy prowadzony jest w aparatach fermentacyjnych w warunkach ciągłego napowietrzania i mieszania.

Zazwyczaj stosowane w przemyśle fermentacyjnym w procesie biosyntezy antybiotyków wartości prędkości obwodowych mieszadeł aparatów fermentacyjnych wynoszą 260—310 m/minutę.

W znanych publikacjach patentowych i literaturowych nie warunkuje się prawidłowego przebiegu procesu biosyntezy ryfamycyny B wartościami prędkości obwodowych mieszadeł, stosowanych w aparatach fermentacyjnych.

W publikacji A. Virgilio, E. Marcelli w *Biotechnology and Bioengineering* (Vol. 271—283, 1964) badano wpływ mocy zużytej na mieszanie na wydajność procesu biosyntezy ryfamycyny.

2

Brak jest danych na temat wpływu mieszania oraz wartości prędkości obwodowej mieszadeł aparatów fermentacyjnych, używanych do hodowli materiału posiewowego na otrzymaną wydajność procesu biosyntezy ryfamycyny B.

Współczesne tendencje w biosyntezie antybiotyków idą w kierunku zwiększania mocy, zużywanej na mieszanie oraz zwiększania wartości prędkości obwodowej mieszadeł aparatów fermentacyjnych, z czym wiąże się podwyższanie wydajności procesu biosyntezy.

Nieoczekiwanie okazało się, że w przypadku procesu biosyntezy ryfamycyny B zależności te są odwrotne.

Sposób według wynalazku polega na tym, że hoduje się szczep *Streptomyces mediterranei* na pożywce posiewowej, zawierającej przyswajalne źródła węgla, azotu oraz sole mineralne i utrzymanym materiałem posiewowym szczepi się pożywkę produkcyjną, zawierającą przyswajalne źródła węgla, azotu, sole mineralne i inhibitory tworzenia innych ryfamycyn, przy czym hodowlę na pożywce posiewowej prowadzi się przy wartości prędkości obwodowej mieszadeł aparatów fermentacyjnych 100—120 m/minutę, a proces fermentacji na pożywce produkcyjnej przy wartości prędkości obwodowej mieszadeł aparatów fermentacyjnych 160—190 m/minutę.

Sposobem według wynalazku szczególnie korzystne wyniki osiąga się przy prowadzeniu hodowli szczepu *Streptomyces mediterranei* w wyżej opisa-

nych warunkach mieszania na pożywce posiewowej o następującym składzie:

glukoza	30	g	5
mąka z nasion bawełny	10	g	
wyciąg namokowy kukurydzy 50%	20	g	
CaCO ₃	5	g	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	6	g	
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0,05	g	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,05	g	15
glikol polialkenowy UCON	1,25	g	
smalec	1,25	g	
woda wodociągowa	1000	ml	

Pożywka o takim składzie znana jest jako pożywka posiewowa, stosowana do hodowli szczepu *Streptomyces mediterranei*, produkującego ryfamycynę S.

Nieoczekiwanie okazało się, że pożywka ta jest szczególnie odpowiednia jako pożywka posiewowa także do hodowli szczepu *Streptomyces mediterranei*, wytwarzającego ryfamycynę B w warunkach mieszania, stanowiących istotę sposobu według wynalazku.

Materiał posiewowy, otrzymany przy zazwyczaj stosowanych wartościach prędkości obwodowej mieszadeł aparatów fermentacyjnych, charakteryzuje się szybką fragmentacją grzybni, spowodowaną nadmiernymi wartościami prędkości obwodowej mieszadeł, co stanowi zasadniczą wadę tego materiału i znacznie obniża jego przydatność do procesu biosyntezy ryfamycyny B.

Proces fermentacji ryfamycyny B, prowadzony przy zazwyczaj stosowanych wartościach prędkości obwodowej mieszadeł aparatów fermentacyjnych (260—310 m/minutę) przebiega w sposób nietypowy, charakteryzuje się szybkim i nieefektywnym zużyciem cukrów, zawartość biomasy w końcowym etapie procesu wynosi około 60%, co znacznie utrudnia proces izolacji, natomiast zawartość ryfamycyny B jest niska i wynosi około 1800 mcg/ml brzeczki.

Sposób otrzymywania ryfamycyny B według wynalazku gwarantuje prawidłowy przebieg procesu biosyntezy.

Materiał posiewowy, otrzymywany w wyżej podanych warunkach mieszania, charakteryzuje się typowym wyglądem mikroskopowym grzybni: nie obserwuje się szybkiego procesu jej fragmentacji oraz gwałtownego spadku pH, co umożliwia ustalenie optymalnego momentu szczepienia pożywki produkcyjnej.

Proces fermentacji na pożywce produkcyjnej w wyżej opisanych warunkach mieszania charakteryzuje się wolniejszym zużyciem cukrów i powolnym przyrostem biomasy, która w końcowym okresie procesu wynosi 35—40%, a zawartość ryfamycyny B wynosi 4000—4500 mcg/ml brzeczki.

Porównanie wyników hodowli szczepu *Streptomyces mediterranei* na pożywkach posiewowych (P-72) i produkcyjnych (FO) przy wartości prędkości obwodowych mieszadeł stosowanych standardowo i sposobem według wynalazku przedstawia tablica 1.

Tablica 1

Pojemność aparatu w m ³	Prędkość obwodowa mieszadeł m/minutę	Ryfamycyna B w mcg/ml wyniki z pilotażu
0,25	240	2000
	100	5600
0,8	240	1800
	120	5000
2,0	240	1800
	120	5200
6,0	265	1800 x
	162	4500 x

x — wyniki, otrzymane bezpośrednio w aparatach fermentacyjnych.

Poniższe przykłady wyjaśniają istotę wynalazku, nie ograniczając jego zastosowania.

Przykład I. Szczep *Streptomyces mediterranei*, wytwarzający ryfamycynę B, hodzi się na podłożu agarowym o następującym składzie: ekstrakt drożdżowy 4 g, ekstrakt słodowy 10 g, glukoza czysta 4 g, płatki owsiane 20 g, woda destylowana 1000 ml. Pożywkę agarową wyjaławia się w temperaturze 120°C w ciągu 30 minut, tworząc agary skośne, które szczepi się strzępkami szczepu *Streptomyces mediterranei*, zliofilizowanymi w nosniku — mleku odtłuszczonego. Agary skośne inkubuje się w temperaturze 28°C w ciągu 7 dni.

Zdezintegrowanymi uprzednio strzępkami *Streptomyces mediterranei*, pochodzącymi z hodowli agarowej, szczepi się 1 litr podłoża P-73 o następującym składzie: glukoza 30 g, wyciąg namokowy kukurydzy 50% 20 g, mąka z nasion bawełny 10 g, (NH₄)₂SO₄ 6 g, CaCO₃ 5 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0,05 g, MnSO₄ · 5H₂O 0,05 g, glikol polialkenowy UCON 1 g, woda wodociągowa 1000 ml, wartość pH po wyjałowieniu 6,4—6,8.

Zaszczepione podłoże inkubuje się w warunkach tlenowych na trzęsawce obrotowej o 150 obrotach/minutę przez 72 godziny w temperaturze 28°C. Otrzymanym inoculum szczepi się podłoże P-73 o podanym powyżej składzie. Po 60 godzinach inkubacji otrzymanym materiałem posiewowym w ilości 10% szczepi się podłoże P-73 (druga generacja materiału posiewowego). Następnie po upływie 30 godzin inkubacji otrzymanym materiałem szczepi się podłoże produkcyjne FO. Do szczepienia używa się 10% materiału posiewowego.

Skład podłoża FO jest następujący:

mąka arachidowa 25 g, mąka sojowa 10 g, KH₂PO₄ czysty 1 g, (NH₄)₂SO₄ czysty 10 g, MgSO₄ · 7H₂O czysty 1 g, glukoza krystaliczna 110 g, gliceryna czysta 40 g, kreda włoska 11 g, sól sodowa weronalu 1,7 g, glikol propylenowy 5 g, FeSO₄ · 7H₂O czysty 0,01 g, CuSO₄ · 5H₂O czysty 0,0033 g, ZnSO₄ · 7H₂O czysty 0,05 g, CoCl₂ · 4H₂O czysty 0,002 g, MnSO₄ · 4H₂O czysty 0,004 g, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ ·

· 4H₂O czysty 0,001 g, glikol polialkenowy UCON 1,25 g, smalec 1,25 g, woda wodociągowa 1000 ml.

Po 220 godzinach prowadzenia procesu biosyntezy ryfamycyny B w aparacie fermentacyjnym o prędkości obwodowej mieszadła 162 m/minutę w warunkach tlenowych przy ciągłym mieszaniu otrzymano 4200 mcg/ml ryfamycyny B w brzecze, oznaczonej metodą Caratorta et al. (Farmaco 5, 303, 1970). Biomasa, oznaczona po zakończonym procesie, wynosiła 40%. Biomase oznaczano metodą wirowania przy 3000 obrotach/minutę w ciągu 15 minut.

Przykład II. Sposobem, opisanym w przykładzie I, zaszczepiono 150 litrów podłoża P-73, przygotowanego w posiewowym aparacie fermentacyjnym.

Po 66 godzinach inkubacji otrzymanym materiałem posiewowym zaszczepiono 1500 litrów podłoża P-73. Po 36 godzinach inkubacji materiał ten użyto do szczepienia podłoża FO, przygotowanego w aparacie o prędkości obwodowej mieszadła 188 m/minutę.

Po 190 godzinach prowadzenia procesu w warunkach tlenowych przy ciągłym mieszaniu otrzymano 4120 mcg/ml ryfamycyny B w brzecze, ozna-

czanej jak w przykładzie 1. Biomasa, oznaczona metodą wirowania, wynosiła 42%.

Zastrzeżenia patentowe

- 5 1. Sposób otrzymywania ryfamycyny B, polegający na tym, że hoduje się szczep *Streptomyces mediterranei* na pożywcę posiewowej, zawierającej przyswajalne źródła węgla, azotu oraz sole mineralne i otrzymanym materiałem posiewowym
 - 10 10 szczepi się pożywkę produkcyjną, zawierającą przyswajalne źródła węgla, azotu, sole mineralne i inhibitory tworzenia innych ryfamycyn, **znamienny tym**, że hodowlę na pożywcę posiewowej prowadzi się przy wartości prędkości obwodowej mieszadeł aparatów fermentacyjnych 100—120 m/minutę, a proces fermentacji na pożywcę produkcyjnej
 - 15 15 przy wartości prędkości obwodowej mieszadeł aparatów fermentacyjnych 160—190 m/minutę.
 - 20 2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako pożywkę posiewową stosuje się pożywkę, składającą się z glukozy 30 g, mąki z nasion bawełny 10 g, wyciągu namokowego kukurydzy 50% 20 g, (NH₄)₂SO₄ 6 g, CaCO₃ 5 g, MnSO₄ · 5H₂O 0,05 g, ZnSO₄ · 7H₂O 0,05 g, glikolu polialkenowego UCON
 - 25 25 1,25 g, smalcu 1,25 g, wody wodociągowej 1000 ml.