

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

199552
(11) (B2)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

(22) Přihlášeno 04 05 73
(21) {PV 3196-73}

(32) {31} {33} Právo přednosti od 05 05 72
{23926-A/72} Itálie

(40) Zveřejněno 31 10 79

(45) Vydáno 15 07 83

(51) Int. Cl.³
C 12 P 1/06

(72)

Autor vynálezu

WHITE RICHARD JOHN, COMO a LANCINI GIANCARLO, PAVIA (Itálie)

(73)

Majitel patentu

GRUPPO LEPETIT S.p.A. MILÁNO (Itálie)

(54) Způsob výroby antibiotika rifamycinu B

1

Vynález se týká způsobu výroby antibiotika rifamycinu B, zejména izolace některých mutantů kmene *Streptomyces mediterranei*, které produkují pouze rifamycin B, a to nezávisle na přítomnosti diethylbarbituranu sodného ve fermentačním prostředí.

Je známo, že *Streptomyces mediterranei* produkuje na běžných růstových prostředích skupinu antibiotik, která jsou zahrnována pod společný název rifamycinový komplex [P. Sensi a další, 1959, *Antibiotios Annual* 1959—160, str. 262]. Další práce ukázaly, že přidá-li se k živnému prostředí diethylbarbituran sodný, dojde k tvorbě jediného fermentačního produktu, kterým je rifamycin B (Margalith P. a Pagani H., *Applied Microbiology*, 9, 325, 1961). Přídavek barbituranu v průmyslovém měřítku však má některé nevýhody, například vyšší cenu živného prostředí a zpomalení rychlosti růstu produkčních kmenů, což v některých případech má za následek pokles výtěžku antibiotika.

Předmětem vynálezu je tedy způsob výroby antibiotika rifamycinu B, vyznačující se tím, že se pěstuje za aerobních podmínek kmen *Streptomyces mediterranei* M 18 ATCC 21789 ve vodném živném prostředí, a to v prostředí o složení:

2

glukóza	96	g
síran amonný	16	g
dihydrofosforečnan draselný	2	g
síran hořečnatý heptahydrát	1	g
uhličitan vápenatý	17	g
síran měďnatý pentahydrát	0,0033	g
síran železnatý heptahydrát	0,01	g
síran zinečnatý heptahydrát	0,05	g
síran manganatý tetrahydrát	0,04	g
chlorid kobaltnatý heptahydrát	0,002	g
heptamolybdenan šestiamonný tetrahydrát	0,001	g
voda	1000	ml
popřípadě diethylbarbituran sodný	2	g

nebo v prostředí o složení

glukóza	126,5	g
uhličitan vápenatý	9,5	g
mouka z burský oříšků	25	g
sójová mouka	10,	g
síran amonný	1	g
síran hořečnatý hexahydrát	1	g
síran železnatý heptahydrát	0,01	g
síran měďnatý pentahydrát	0,0033	g
síran zinečnatý heptahydrát	0,050	g
síran manganatý pentahydrát	0,004	g
chlorid kobaltnatý hexahydrát	0,002	g

heptamolybdenan šestiamonný tetrahydrát	0,001 g
voda	1000 ml
popřípadě diethylbarbituran sodný	1,5 g

Živné prostředí se nejprve sterilizuje, načež se provádí fermentace při teplotě 25 až 35 °C po dobu 140 až 200 hodin, fermentační prostředí se pak upraví na pH 2,0 kyselinou chlorovodíkovou, extrahuje se ethylacetátem a rifamycin B se z organického extraktu izoluje extrakcí fosfátovým pufrům o pH 7,38.

Izolace mutant

Na suspenzi spór *Streptomyces mediterranei* ATCC 13685 se působí N-methyl-N'-nitroso-N-nitroguanidinem o koncentraci 1 mg/ml při pH 9,0 v tris-hydroxymethylamino-methanovém pufru 60 minut při teplotě 28 stupňů Celsia. Spóry, podrobené účinku mutagenu se pak promyjí a nanesou na Bennettův agar v Petriho miskách. Po 14 dnech inkubace při teplotě 28 °C se přežívající kolonie zkoumají na svou schopnost produkce rifamycinu B v kapalném živném prostředí za přítomnosti i bez přítomnosti diethylbarbituranu sodného. Ty mutanty, které produkují vysoká množství rifamycinu B v živném prostředí, které neobsahuje diethylbarbituran sodný se dále zkoumají.

Jedna z mutant byla nazvána M 18 a uložena do sbírky ATCC pod číslem 2L89. Její charakteristika bude dále popsána. Další mutanty se od kmene M 18 liší jenom bezvýznamnými vlastnostmi a spadají v podstatě do popisu kmene M 18 v tabulce 4. Podobných výsledků bylo dosaženo tak, že teploty kmen byl podroben ultrafialovému záření nebo působení některých jiných známých chemických mutagenů.

Fermentace

Známý kmen *Streptomyces mediterranei* ATCC 13685 i kmen M 18 byly pěstovány na Bennetově agaru 6 až 8 dní při teplotě 28 °C. Vegetativní kultura byla naočkována koloniemi, které byly předběžně pěstovány na šikmém Bennetově agaru, a to tak, že obsah poloviny zkumavky šikmého agaru byl užit k naočkování jedné baňky a baňky byly inkubovány na rotační třepačce při 28 °C 72 hodin. Živné prostředí, které bylo užito pro vegetativní růst obsahovalo tyto složky:

extrakt z hovězího masa	5 g
extrakt z kvasnic	5 g
pepton	5 g
hydrolyzát kaseinu	3 g
chlorid sodný	1,5 g
voda do	1 litru

pH živného prostředí bylo upraveno hydroxidem sodným na hodnotu 7,3. 100 ml vegetativního prostředí bylo uvedeno vždy do jedné Erlenmeyerovy baňky o obsahu 500 mililitrů. Po 72 hodinách růstu byla kultura užita v množství 5 objemových % k naočkování fermentačního prostředí.

K fermentaci bylo užito zásadně dvou fermentačních prostředí:

RFB 744: syntetické prostředí
RFB 2244: komplexní prostředí.

Fermentace byla prováděna vždy při použití 50 ml prostředí v Erlenmeyerově baňce o obsahu 500 ml.

Dvě používaná živná prostředí měla toto složení:

RFB 744

glukóza	96 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	15 g
KH ₂ PO ₄	2 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
CaCO ₃	17 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,3333 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,05 g
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0,04 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,002 g
(NH ₄) ₆ Me ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	0,001 g
sodná sůl diethylbarbiturátu	2 g
H ₂ O	1000 g
pH před sterilizací	6,8 g
pH po sterilizaci	6,3 g

RFB 2244

glukóza	126,5 g
CaCO ₃	9,5 g
mouka z burských oříšků	25 g
sójová mouka	10 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0033 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,050 g
MnSO ₄ · 5H ₂ O	0,004 g
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,002 g
(NH ₄) ₆ Me ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0,001 g
sodná sůl diethylbarbiturát	1,5 g
pH před sterilizací upraveno	
15% NaOH	7,4 g
pH po sterilizaci	6,2 až 6,3

Do každé baňky s obsahem 50 ml prostředí bylo přidáno 0,2 ml protipěnového prostředku (Antifoam A). Totéž prostředí bylo připraveno i bez sodné soli diethylbarbiturátu pro srovnávací fermentace. Podmínky fermentace jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2 spolu s výtěžky rifamycinu B.

Tabulka 1

Kmen	Rifamycin B v prostředí v $\mu\text{g/ml}$	
	s barbiturátem	bez barbiturátu
Streptomyces mediterranei ATCC 13685	2210	390(*)
Mutanta M 18 ATCC 21789	2290	2240

(*) výsledek znamená horní hranici množství rifamycinu B, protože přítomnost dalších složek komplexu ruší analýzu.

Jako fermentačního prostředí bylo užito

prostředí RFB 2244 s 1,5 g diethylbarbiturátu sodného na litr nebo bez této sloučeniny. Fermentace byla prováděna 190 hodin při teplotě 28 °C.

Tabulka 2

Kmen	Rifamycin B s barbiturátem	($\mu\text{g/ml}$) bez barbiturátu	Rifamycin komplex ($\mu\text{g/ml}$)	
			s barbiturátem	bez barbiturátu
Streptomyces mediterranei ATCC 13685	344	<107	<10	99
Mutant M 18 ATCC 21789	580	513	<10	<10

Použité fermentační prostředí bylo prostředí RFB 744 s 1,5 diethylbarbiturátu sodného na litr nebo bez této sloučeniny. Fermentace byla prováděna na rotační třepačce 144 hodin při teplotě 28 °C.

Obsah rifamycinu B ve zfiltrovaném živném prostředí byl určován diferenciální spektrofotometrií podle publikace Pasqua lucci et. al., Journal of Pharmaceutical Sciences, **59**, 685, 1970.

Stanovení rifamycinového komplexu

Vzorky fermentačního prostředí byly upraveny na pH 2,0 kyselinou solnou a extrahovány ethylacetátem. Organický extrakt byl pak extrahován fosfátovým pufrům o pH 7,38. Za těchto podmínek je pufrům extrahován rifamycin B, kdežto rifamycinový komplex zůstává v organické fázi. V ethylacetátovém roztoku se pak rifamycinový komplex stanoví spektrofotometricky měřením

optické hustoty při 450 nm a srovnáním se vzorkem, který je zředěn ethylalkoholem s obsahem 1% kyseliny asparagové.

Popis kmene Streptomyces mediterranei M 18 ATCC 21789

Růstové vlastnosti kmene Streptomyces mediterranei a jeho mutanty M 18 bylo prováděno tak, že tyto kmeny byly pěstovány na různých standardních prostředích podle Gottlieba a Shirlinga (Methods of characterization of Streptomyces species, Intern. J. Syst. Bact. **16**, 313–340, 1966), mimoto byla ještě užita některá další živná prostředí, doporučená Waksmanem (The actionomyces, sv. II, The William a Wilkings Co., 1961).

V následujících tabulkách jsou uvedeny růstové vlastnosti kmenů M 18 ATCC 21789 a Streptomyces mediterranei ATCC 13685.

Tabulka 3

Využití uhlíkatých sloučenin kmenem Streptomyces mediterranei a mutantou M 18.

Zdroj uhlíku	Streptomyces mediterranei ATCC 13685	Mutanta M 18 ATCC 21789
Inositol	+++	+++
Fruktóza	+++	+++
Rhamnóza	+++	+++
Xylóza	+++	+++
Raffinóza	—	—
Arabinóza	+++	+++
Celulóza	—	—
Sacharóza	+++	+++
(pozitivní kon.)	+++	+++
bez zdroje uhlíku	—	—
(negativní kontrola)	—	—

Srovnání morfologických a růstových vlastností kmene *Streptomyces mediterranei* ATCC 13685 a mutanty M 18 ATCC 21789

Prostředí	<i>Streptomyces mediterranei</i> ATCC 13685	<i>Streptomyces mediterranei</i> M 18 ATCC 21789
Agar s ovesnou moukou	Středně dobrý růst, hladký povrch, vegetativní mycelium šedobělavé až žlutavé s narůžovělou spodní stranou, mycelium na vzduchu bělavé s narůžovělou zadní stranou, stopy žlutavého rozpustného pigmentu	Bohatý růst, hladký povrch, vegetativní mycelium zelenavé až oranžové s hnědavými stíny, vzdušné mycelium se netvoří, žlutozelený rozpustný pigment
Agar s extraktem z kvasnic a glukózou Prostředí č. 2 podle Gottlieba a Shirlinga	Bohatý růst, barva žlutavá až růžová s hrubým povrchem, mycelium na vzduchu velmi chudé, živné prostředí není zbarveno	Bohatý růst, zvrásněný povrch, vegetativní mycelium hnědé s oranžově hnědými okraji, stopy růžově zbarveného vzdušného mycelia, tmavě hnědý rozpustný pigment
Emersonův agar s glukózou	Bohatý růst, kultura žlutá až růžovooranžová s hrubým povrchem, vzdušné mycelium velmi chudé, narůžovělé, živné prostředí se nebarví	Bohatý růst, hladký povrch, vegetativní mycelium oranžové, vzdušné mycelium se netvoří, zlatožlutý rozpustný pigment
Bennettův agar	Dobrý růst, kultura žlutá až oranžově žlutá, mycelium na vzduchu narůžovělé, rozpustný pigment světle hnědý	Mutanta má bohatý růst, velmi zvrásněný povrch, vegetativní mycelium tmavě hnědé s oranžově hnědými okraji, stopy růžového vzdušného mycelia, tmavě hnědý rozpustný pigment
Panasseyův agar	Špatný růst	Bohatý růst s jemným a hladkým povrchem, vegetativní mycelium světle oranžové, vzdušné mycelium se netvoří, stopy světležlutého rozpustného pigmentu
Agar s extraktem z kvasnic a melasou	Bohatý růst, povrch drsný, bezbarvý až žlutavý, vzdušné mycelium žlutavé, tmavě hnědý rozpustný pigment	Bohatý růst s velmi zvrásněným povrchem, vegetativní mycelium černohnědé s oranžově hnědými okraji, stopy růžového vzdušného mycelia, tmavě žlutookrový rozpustný pigment
Czapek-Doxův agar s glukózou	Růst je velmi chudý, povrch kultury jemný, bezbarvý až světle melounový, stopy růžovobílého vzdušného mycelia, rozpustný pigment se netvoří	Bohatý růst, hladký povrch, vegetativní mycelium světle oranžové, vzdušné mycelium se netvoří, rozpustný světle citrónově žlutý pigment
Agar s bramborem	Chudý růst, povrch jemný a bezbarvý, stopy bělavého vzdušného mycelia, rozpustný pigment se netvoří	Bohatý růst, hladký povrch, vegetativní mycelium hnědorůžové
Agar s glukózou a asparaginem	Střední růst, hladký povrch, jemné vegetativní mycelium barvy světleoranžově růžové se žlutavou zadní stranou, mycelium na vzduchu se netvoří, malé množství světle žlutého rozpustného pigmentu	Bohatý růst, hladký povrch, oranžové vegetativní mycelium, vzdušné mycelium, se netvoří, stopy citrónově žlutého rozpustného pigmentu

Prostředí	Streptomyces mediterranei ATCC 13685	Streptomyces mediterranei M 18 ATCC 21789
Agar s asparaginem (živné prostředí č. 5 podle Gottlieba a Shirlinga)	Střední růst, hladký povrch, jemné vegetativní mycelium barvy světleoranžově růžové se žlutavou zadní stranou, mycelium na vzduchu se netvoří, malé množství světle žlutavého rozpustného pigmentu	Bohatý růst, jemný a hladký povrch, světleoranžové vegetativní mycelium, vzdušné mycelium ani rozpustný pigment se netvoří
Živný agar	Středně dobrý růst, hladký povrch, kultura melounová až oranžová se žlutavě oranžovou zadní stranou, vzdušné mycelium růžovo-bílé, rozpustný pigment se netvoří	Bohatý růst, hladký povrch, oranžové vegetativní mycelium, vzdušné mycelium se netvoří, světle žlutý rozpustný pigment
Prídhmův agar	Mírný růst, povrch kulturv hladký, bezbarvý s červenými skvrnami, mycelium na vzduchu růžové, živné prostředí se nebarví	Bohatý růst, hladký povrch, vegetativní mycelium světle oranžové s malými skvrnami cihlově červené barvy, stopy růžového vzdušného mycelia, žlutý rozpustný pigment
Agar se škrobem (prostředí č. 4 podle Gottlieba a Shirlinga)	Špatný růst, kultura bezbarvá až světle oranžově růžová. Chudé bílé vzdušné mycelium, hydrolýza za škrobu pochybná	Bohatý růst, hladký povrch, vegetativní mycelium sytě oranžové s hnědavými stíny, vzdušné mycelium růžové a bohaté, chromově žlutý rozpustný pigment, hydrolýza škrobu negativní
Agar s dextróou a triptonem	Bohatý růst, kultura oranžově růžová se zadní stranou žlatožlutou až oranžovou, růžové vzdušné mycelium, světle žlatožlutý rozpustný pigment	Bohatý růst, zvrásněný povrch, vegetativní mycelium oranžové, vzdušné mycelium se netvoří, žlutý rozpustný pigment
Hickeyův a Tresnerův agar s kobaltem	Dobry růst, kultura šedobílá až světle růžovo-oranžová, narůžovělé vzdušné mycelium, žlutavý rozpustný pigment	Bohatý růst, hladký povrch, vegetativní mycelium hnědorůžové, stopy růžového vzdušného mycelia, hnědorůžový rozpustný pigment
Agar s tyrosinem (prostředí č. 7 podle Gottlieba a Shirlinga)	Špatný růst	Bohatý růst, zvrásněný povrch, vegetativní mycelium sytěoranžové s hnědavým nádechem, vzdušné mycelium se netvoří, žlutý rozpustný pigment, reakce na tyrosinázu silně pozitivní
Agar s maleinanem vápenatým	Dobry růst, kultura bezbarvá, mycelium na vzduchu bílé s růžovým nádechem, rozpustný pigment se netvoří, maleinan vápenatý se částečně tráví	Středně dobrý růst, hladký povrch, vegetativní mycelium světle oranžové, mycelium na vzduchu se netvoří, světle citrónově žlutý rozpustný pigment, k natrávení maleinanu vápenatého téměř nedochází
Želatína	Nedochází k pigmentaci, zkapalnění je pomalé a nedokonalé	Nedochází k pigmentaci, zkapalnění želatiny je pozitivní
Bujón s dusičnany	Růst na povrchu s narůžovělým vzdušným myceliem, nedochází k redukci na dusitany, barva bujónu se mění na žlutavou	Růst na povrchu s narůžovělým vzdušným myceliem, dochází k redukci dusičnanů, barva bujónu se mění na žlutavou

Prostředí	Streptomyces mediterranei ATCC 13685	Streptomyces mediterranei M 18 ATCC 21789
Lakmusové mléko	Nedochází k peptonizaci ani koagulaci, slabě alkalická reakce	Nedochází ke koagulaci ani k peptonizaci
Agar s odstředěným mlékem	Bohatý růst, hladký povrch, vegetativní mycelium oranžové, pozitivní hydrolyza kaseinu, růžové vzdušné mycelium, rozpustný pigment se netvoří	Bohatý růst, hladký povrch, vegetativní mycelium oranžové, zlatožlutý rozpustný pigment, mycelium na vzduchu se netvoří, silně pozitivní hydrolyza kaseinu
Agar s peptonem, extraktem z kvasnic a železem [prostředí č. 6 podle Gottlieba a Shirlinga]	Středně dobrý růst, hladký povrch, kultura bezbarvá, stopy bělavého vzdušného mycelia, rozpustný pigment se netvoří, produkce sirovodíku negativní	Středně dobrý růst, jemný hladký povrch, kultura bezbarvá, bez vzdušného mycelia, rozpustný pigment se netvoří, produkce sirovodíku je negativní

Poznámka:

Stanovení barev bylo provedeno podle Maerza a Paula (A dictionary of colour, McGraw-Hill, Inc. N. Y. 1950).

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby antibiotika rifamycinu B, vyznačující se tím, že se pěstuje za aerobních podmínek kmen *Streptomyces Mediterranei* M 18 ATCC 21789 ve vodném živném prostředí, a to v prostředí o složení

glukóza	96	g
síran amonný	15	g
dihydrofosforečnan draselný	2	g
síran hořečnatý heptahydrát	1	g
uhlíčitán vápenatý	17	g
síran měďnatý pentahydrát	0,0033	g
síran železnatý heptahydrát	0,01	g
síran zinečnatý heptahydrát	0,05	g
síran manganatý tetrahydrát	0,04	g
chlorid kobaltnatý heptahydrát	0,002	g
heptamolybdenan šestiamonný tetrahydrát	0,001	g
voda	1000	ml
popřípadě		
diethylbarbituran sodný	2	g

nebo v prostředí o složení

glukóza	126,5	g
uhlíčitán vápenatý	9,5	g
mouka z burských oříšků	25	g
sójová mouka	10	g
síran amonný	1	g
síran hořečnatý hexahydrát	1	g
síran železnatý heptahydrát	0,01	g
síran měďnatý pentahydrát	0,0033	g
síran zinečnatý heptahydrát	0,050	g
síran manganatý pentahydrát	0,004	g
chlorid kobaltnatý hexahydrát	0,002	g
heptamolybdenan šestiamonný tetrahydrát	0,001	g
voda	1000	ml
popřípadě		
diethylbarbituran sodný	1,5	g

živné prostředí se nejprve sterilizuje, načež se provádí fermentace při teplotě 25 až 35 stupňů Celsia po dobu 140 až 200 hodin, fermentační prostředí se pak upraví na pH 2,0 kyselinou chlorovodíkovou, extrahuje se ethylacetátem a rifamycin B se z organického extraktu izouluje extrakcí fosfátovým pufrem o pH 7,38.