



[12] 发明专利申请公开说明书

[11] CN 85 1 07552 A

C12P 21/04
A61K 37/02
C12N 1/00
//(C12P 21/04
C12R 1:465)

CN 85 1 07552 A

[43] 公开日 1987年5月20日

[21] 申请号 85 1 07552

[22] 申请日 85.10.8

[30] 优先权

[32] 85.10.9 [33] 美国 [31] 658,979

[71] 申请人 伊莱利利公司

地址 美国印第安纳州印第安纳波利斯

[72] 发明人 弗洛伊德·米尔顿·休伯

理查德·路易斯·皮珀

安东尼·约瑟夫·蒂尔特斯

汤姆·爱德华·伊顿 林达·马克辛·福特

小奥蒂斯·韦伯斯特·戈弗雷

马丽·路易丝·布朗·休伯

小米尔顿·约瑟夫·兹米朱斯基

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 刘元金 罗 宏

[54] 发明名称 A-21978C衍生物生产方法改进

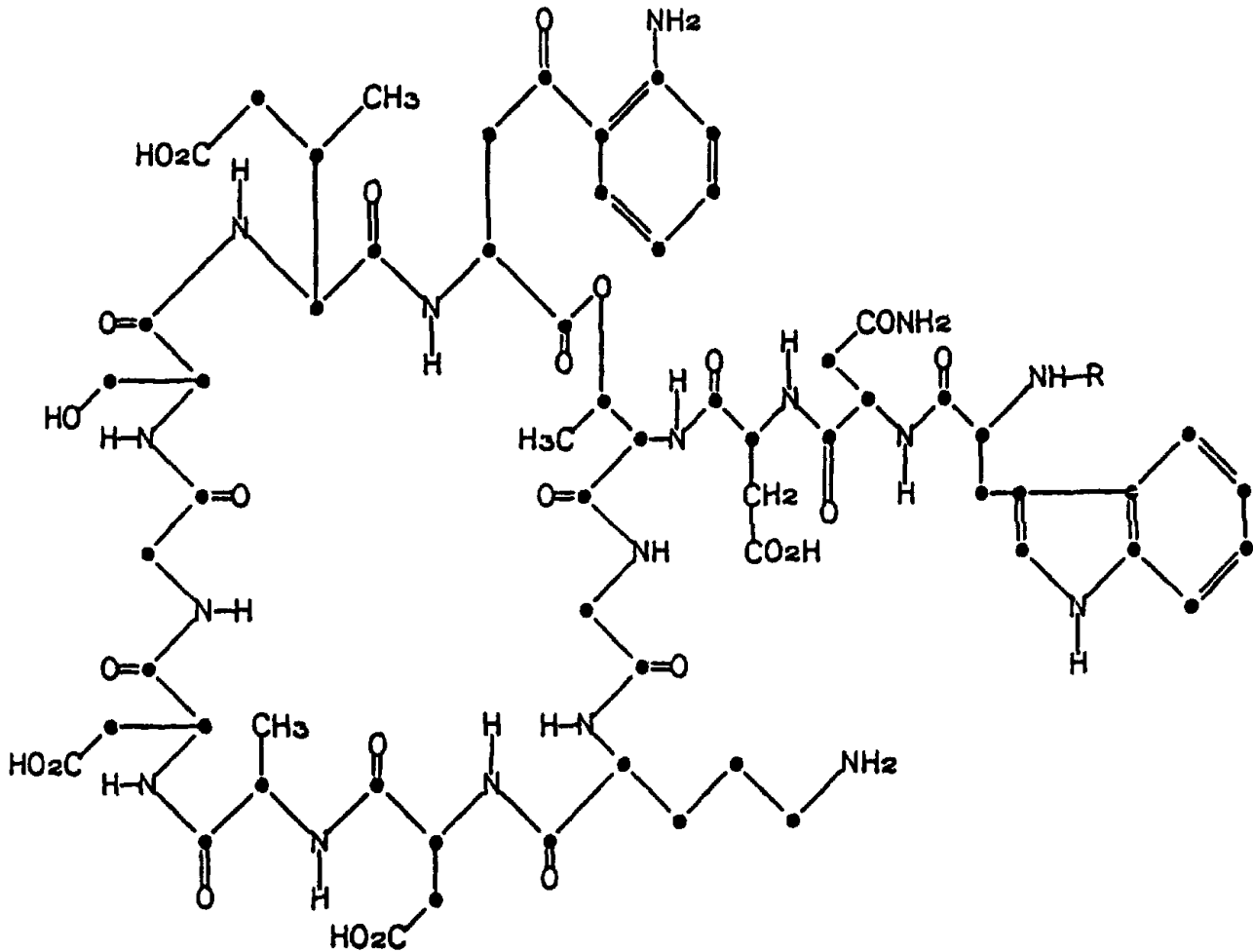
[57] 摘要

提供一种用于制备具有2个碳原子到14个碳原子的链烷酰基侧链的A-21978C环状肽衍生物的经过改进的方法,包括在发酵生产步骤中,把某种2个碳原子到14个碳原子的链烷酸,或者它们的一种酯或盐,加入到产生A-21978C的培养物中。此外,提供了制备A-21978C抗菌素的新方法,包括在需氧条件下培养一种新的微生物菌种。

871A04637/02-182

权 利 要 求 书

1、其特征是一种分子式为 (I) 的某种 A-21978 C 衍生物的制备方法：



其中，R是2个碳原子到14个碳原子的链烷酰基，包括提供相应的2个碳原子到14个碳原子的链烷酸，或其酯，或其盐，到一种产生A-21978 C的培养物中。

2、按照权利要求1的方法，其中，是使用2个碳原子到14个碳原子的链烷酸。

3、按照权利要求1的方法，其中，是使用2个碳原子到14个

碳原子的链烷酸的一个碳原子到 4 个碳原子的烷基酯。

4、按照权利要求 1 的方法，其中，是利用 2 个碳原子到 14 个碳原子的链烷酸的盐。

5、按照权利要求 1 到 4 的任何一种方法，其中，是使用癸酸，或其酯或盐。

6、按照权利要求 1 的方法，其中，所使用的 2 个碳原子到 14 个碳原子的链烷酸是辛酸，壬酸，十一烷酸，月桂酸，或者它们的酯或盐。

7、按照权利要求 1 到 6 的任何一种方法，其中产生 A-21978 C 的培养物包括了 *Streptomyces (链霉素) roseosporus* NRRL 11379，或者为其一种突变体，变异体或重组体。

8、按照权利要求 7 的方法，其中，培养物包括 *Streptomyces (链霉素) roseosporus* NRRL _____，或者一种 A-21978 C 产生的变异体，突变体，或者。

9、其特征是一种制备抗菌素 A-21978 C 复合物或因子的制备方法，其中包括培养 *Streptomyces roseosporus* NRRL _____，或者某种 A-21978 C 产生的变异体，突变体或重组体。在培养物培养基中，包括了可同化碳源、氮、和无机盐。在液内需氧发酵的条件下进行，直至生产出 A-21978 C 抗菌素，并且，如果需要，可以分离出所生产的 A-21978 C 抗菌素，并进一步从复合物中分别分离出 A-21978 C 的各个因子。

10、按照权利要求 9 的一种制备抗菌素 A-21978 C 复合物的方法，它包括了从培养物培养基中分离出 A-21978 C 复合物的附加的步骤。

11、按照权利要求 9 或 10 的制备抗菌素 A-21978 C 分别为 C₀, C₁, C₂, C₃, C₄ 或者 C₅ 的因子的一种方法, 它包括了从 A-21978 C 抗菌素复合物中分离出每一种因子的附加的步骤。

12、其特征是一种生物制制纯的 *Streptomyces* (链霉素) *roseosporus* NRRL _____ 培养物, 或者它们的一种突变体, 变异体或者重组体。

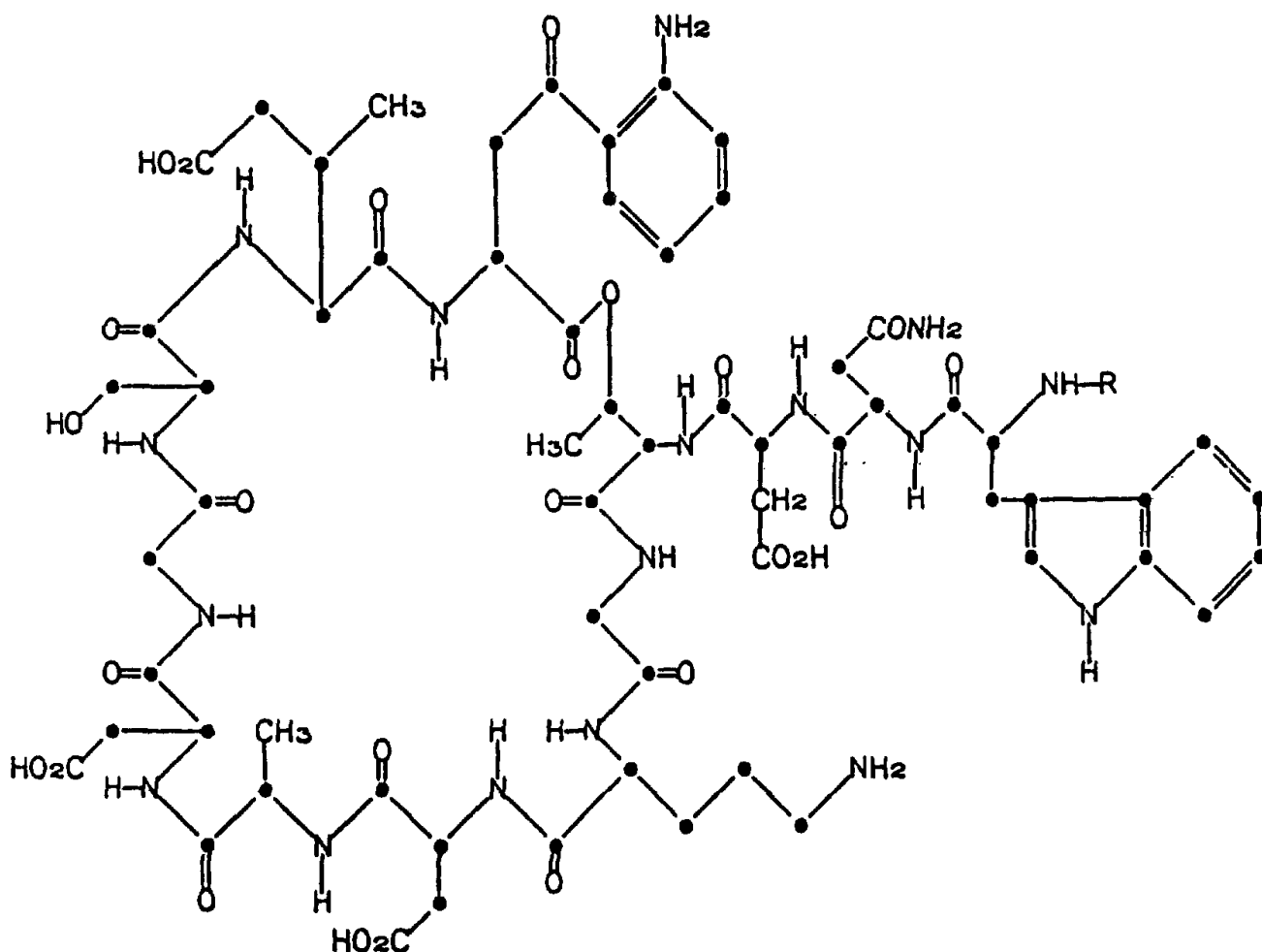
13、其特征是 *Streptomyces* (链霉素) *roseosporus* NRRL _____,

14、按照权利 1 到 8 的任何一种方法所制备的分子式为 (I) 的 A-21978 C 衍生物。

15、按照权利要求 9 到 11 的任何一种方法所制备的 A-21978 C 复合物或者它的各别的 A-21978 C 抗菌素因子。

A-21978 C 衍生物生产方法改进

本发明是有关分子式为 (I) 的 A-21978 环状肽抗菌素衍生物的经过改进的制备方法，其中 R 是 C_2-C_{14} 的链烷基。特别是这



种经过改进的方法包括 3 在发酵时把 2 个碳原子到 14 个碳原子的链烷酸提供给产生 A-21978 C 的培养物。这个方法的优点是：

- (1)、生产步骤较原有的方法少，
- (2)、产量提高，
- (3)、须要的时间少。

这种 A-21978 C 系列抗菌素是很好的抗菌药物，A-21978 C 的诸多衍生物中，具有分子式 (I) 的一组尤为重要，(也可参见专利号为 4,537,717 的美国专利 . Bernard . J . Abbott , David S Fukuda and Manuel Debono .)。过去，这些衍生物的制备需要某种多级步骤，该多级步骤费时间，产量低，而且价格昂贵。而本发明则提供了制备这些 A-21978 C 衍生物的一种经过改进的方法。原有的制备一种分子为 (I) 的衍生物的方法，例如：制备 A-21978 C 的正-癸酰基衍生物，需要下列步骤：

- 1、产生 A-21978 C 培养物的发酵过程
 - a、用一种液体氮安瓿开始。
 - b、初级接种步骤 (48 小时)。
 - c、二级接种步骤 (24 小时)。
 - d、三级接种步骤 (24 小时)。
 - e、发酵 (140 小时)。
- 2、过滤，树脂吸附和洗脱，及浓缩
- 3、制备 t-BOC 复合物 (即被保护的叔丁氧基羰基)
- 4、对被保护的复合物进行浓缩
- 5、脱酰基培养物的发酵，如使用游动放线菌属 (*Actinoplanes utahensis*)
 - a、用一种液体氮安瓿开始。
 - b、初级接种步骤 (72 小时)。
 - c、二级接种步骤 (48 小时)。
 - d、发酵 (67 小时)。
- 6、带有脱酰基培养物的复合物的脱酰基作用。

- 7、过滤，树脂吸附及洗脱，浓缩。
- 8、再酰化作用。
- 9、保护基团的水解。
- 10、最后进行纯化。

本发明的新的方法包括了在发酵生产步骤中（步骤1的e），把一种具有2个碳原子到14个碳原子的链烷酸（一种ROH化合物，其中，R如同上述规定），或者它们的一种酯或者盐，加入到产生A-21978 C培养物中，以得到与分子式(I)相对应的化合物，使用这个方法，就可以省去原方法中的3，4，5，6，7，8和9的步骤，此外，这种新的方法可以明显的提高产量，其所得到的产量大大超过了使用原有方法所获得的收率。

Streptomyces (链霉素) roseosporus 菌种 NRRL 11379 (A-21978.6) 和 NRRL _____ (A-21978.65)，一种 NRRL 11379 的突变体菌种，是产生 A-21978 C 培养物的有用的菌种。这些培养物它们贮存在北部雷金纳 (Northern Regional) 研究中心，美国农业部，农业研究机构，伊利诺期州，皮奥利亚市 61604 借此，可以以登记号为 NRRL 11379 和 NRRL _____，而向公众提供。该 S-roseoporus NRRL 11379 培养物和 A-21978 C 抗菌素的生产使用条件，已经由 Robert L. Hamill 和 Marvin M. Hoehn 在美国专利 (US 4,331,594) 中进行说明了，在此处，可以结合该专利作为参考。

虽然在本发明的方法中，所指定了的 A-21978.6 和 A-21978.65 是较好的微生物菌种，但是任何生产 A-21978 C 的培养物都可以使用。本技术领域中的技术熟练的人们会了解哪种菌种

会对本方法有用。

在美国专利 US 4,331,591 所介绍的天然产生的 A-21978 C 因子是 C₀, C₁, C₂, C₃, C₄ 和 C₅。在 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅ 的众因子中, 在式 (I) 中的 R 是一种特殊的 10 个碳原子到 12 个碳原子的烷酰基, A-21978 C 因子 C₀, 很容易想到, 它是一种具有单一支链化的, 有 10 个碳原子的烷酰基侧链, 已经发现, 它们是二种组份的混合物, 二种组份大致的比例为 2:1, 其中, 主要的组份是带有 10 个碳原子的以支链作为侧链的组份, 较少的组份是具有 10 个碳原子的以直链作为侧链的组份。

为了便于讨论, 使用本发明的方法而制备的分子式为 (I) 的化合物, 也称作 A-21978 C 因子, 除了天然产生的因子外, 通常用侧链的长度表示因子。从而, 例如, 分子式为 (I) 的化合物, 其中 R = 辛酰基, 当使用本发明的方法进行制备时, 则被称作一种 A-21978 C₈ 因子。

在本发明的方法中, 所用的 2 个碳原子到 14 个碳原子的链烷酸、酯或盐, (基质, The substrate) 可以是直链, 也可以是支链化合物, 例如, 为了制备天然产生的 A-21978 C 的因子 C₁, C₂, C₃, 可以使用一种 8-甲基正十二烷酸, 10-甲基正十二烷酸, 或者 10-甲基十一烷酸, 酯或者盐, 由于 2 个碳原子到 14 个碳原子的直链酸, 酯或盐容易得到, 成本低, 因此推荐用于本方法中, 特别好的基质, (Substrate) 是正十二烷酸, 它的酯或者盐。

当使用 2 个碳原子到 14 个碳原子的链烷酸酯时, 推荐使用 C₁-C₄ 的烷基酯, 在这样一种酯中, 1 个碳原子到 4 个碳原子的烷基可以是直链, 或者是支链。

在这个方法中，所使用的典型的2个碳原子到14个碳原子的链烷酸的适宜的盐，包括了链烷酸与碱金属或者碱土金属所形成的盐，例如钠，钾，锂，铯，铷，钡，钙或镁。合适的胺盐包括1个碳原子到4个碳原子的伯，仲，叔烷基铵盐和羟基—C₂—C₄—烷基铵盐。

这种酶作用物 (Substrate)，最好是以无菌液的形式加入到发酵过程中，用在这种方法的溶剂，虽然可以使用乙醇，醋酸乙酯，和1个碳原子到4个碳原子的不饱和脂肪酸的酯，但是特别有用的溶剂是油酸甲酯，如果，这种基质，(The substrate)，在发酵温度下，是一种适当的液体，则可以直接把这种基质 (substrate) 加入其中。

这种基质 (substrate) 的加入速率必须是够低，以避免发酵中产生中毒作用，不过加入速率高，则可足以提高所希望得到的分子式为(I)的化合物的产量。每小时对每升发酵液建议其加入速率大约为0.1到0.2毫升。

在发酵生产步骤时，这种基质 (Substrate) 是生产A-21978 C培养物正处于生长阶段时而被加入其中的，从大约在15小时到32个小时才开始加入，并继续加入，直至发酵作用终止。这种基质 (Substrate) 的加入方式可以是以各种不同的方法而加入，但最好的加入方式是能通过某种能更接近于稳定流动状态的方式而加入。

接着，进行发酵，如果需要，则可以用已知的工艺步骤来回收所产生的分子式(I)的化合物 (也见美国专利US 4,331,594)

本发明也提供了上面已经提到的新型微生物，Streptomyces (链霉菌) Roseosporus NRRL ——，这种微生物也能产生A-21978 C抗菌素。本发明特别涉及到一种经过改进的，用于生产A-

A-21978 C 抗菌素的方法，这种方法是通过在液内需氧发酵的条件下，通过培养新型的 Streptomyces roseosporus，NRRL_____ 的菌种，直至产生出基本上达到 A-21978 C 抗菌素的水准。该 A-21978 C 的抗菌素复合物可以用极性有机溶剂从发酵液和菌丝体中萃取出来，这种 A-21978 C 的各个因子也可以用本领域中人所共知的技术如柱上色谱分析法来进一步纯化。

一般，从天然状态中分离出来的培养物（称野生型“ The Wild type ”），用来生产的抗菌素，其产量低，抗菌素的生产常常是不稳定的。因此，使用高效的菌种来不断地生产抗菌素是有很大的价值的。

本发明的目的是提供某种经过很大改进的用来制备 A-21978 C 抗菌素的方法，该方法是通过培养 Streptomyces（链霉菌）roseosporus NRRL_____，或者通过培养某种 A-21978 C 产生的突变体，变异体，或者它们的重组体，在一种培养物培养基中，该培养物培养基包括可同化源碳源，氮和无机盐，在液内需氧发酵的条件下，直至生产出 A-21978 C 的抗菌素。这种 A-21978 C 抗菌素复合物，或者它的各个单独的因子，可以使用本领域已知的不同的分离和纯化步骤来加以回收。

本发明的这一部份的微生物，已经被称为 A-21978.65。这个菌种是通过菌种选择和从已经被定名为 A-21978.6 的菌种（NRRL 11379）中发生突变作用而培育出来的。Frederick P. Mertz 和 Ralph.E.Katne（Lilly 研究实验室）已经对这种 A-21978.6 菌种进行了研究和鉴定。该 A-21978.6 是从土耳其的亚拉拉特山的土块中选择出母体菌种而周转培育出来的这种

A-21978.6 菌种被下列人员即 Falcã de Morias 和 Dalia Maria 等人于 1961 年，被作为新的菌种而归类于 Streptomyces (链霉素) Roseosporus。这种分类是与已经出版的出版物所叙述的内容相比较而作出的 [即 R.E. Buchanan 和 N.E. Gibbons 的“Bergey 的细菌学测定手册” William 和 Wilkins 公司 8th. Ed., 1974; 和 E.B. Shirling 及 D. Gottlieb, 的“链霉菌素类菌种的共同说明” intern. Journal of Systematic Bacteriol 808-809 (1972)]。

这种分类是以国际链霉菌素项目所推荐的方法 [E.B. Shirling 和 D. Gottlieb. “链霉菌素种的鉴定方法”，在 Intern. Journal of Systematic Bacteriol. 16, 313-340 (1966)]，以及相关的辅助实验作为基础而作出的。

在 ISP 9[#] 基础培养基上，决定碳的使用的量，在该基础培养基中，所加入的碳源，其最终达到的浓度是 1.0%。碳源通过过滤作用而达到无菌，这种基础培养基是用高压灭菌作用而达到无菌。基片在 30°C，经过 14 天的接种过程之后，可以被辨认出来。

其细胞壁结晶，可以利用改进的 Lechevalier 的方法来加以测定，(M.P. Lechevalier, “关于分离放线菌素到属的化学方法”。由美国微生物放线菌委员会小组专门小组主办。由 Dr. Thomas G. Priddyham, Convenor; 在下列部门举行，即微生物研究所，Rutgers 大学及在美国的新泽西州，新布鲁诺兹友市，新泽西的州立大学，1971年)。

二氨基庚二酸的异构物是利用 Becker 等人的方法进行测定，[B. Becker, et al, “利用整个细胞水解的纸上色谱方法快速

区分诺卡氏菌 (*Nocardia*) 和链霉素菌 (*Streptomyces*)”。
Appl. Microbiol 11, 421—423 (1964)]。

分析氨基酸是利用洗涤细胞壁断裂物的方法来进行，类黑色素的测定是利用 ISP 1 # (胰蛋白—酵母菌提取物培养物)，ISP 6 # (胨—酵母菌提取物，铁琼脂)，ISP 7 # (酪氨酸琼脂)，改进的 ISP 7 # (即 ISP 7 # 不含有酪氨酸)，及某种酪氨酸鉴定 [Yuzuru Mikami, et, al 的“改进的链霉素 Arai 和 Mikani 黑色素形成试验”，发表于 *Intern. journal of Systematic Bactriol.* 27 (3), 290 (1977)]。测定淀粉水解物是使用淀粉与碘的实验方法来进行。

利用 ISP 2 # 琼脂培养基，来进行温度范围，耐 NaCl 性质，*PH* 范围，和抗菌素敏感性的试验。其温度范围是 25，28，30，34，37，40，45，50 和 55 °C。抗 NaCl 性质是利用把 NaCl 加入到琼脂中来进行测定。其用量相当于 0，1，2，3，4，5，6，8，10 和 12 %。这些都是在 30 °C 温度下进行培养。测定 *PH* 范围是调节琼脂使其 *PH* 值从 3.0 到 11.0，按每次以 1.0 的 *PH* 单位而递增，正好在下一次调节 *PH* 之前来进行测定。抗菌素敏感性试验，是使用将敏感性的磁盘垫在已接种的琼脂板上的方法来进行测定的。

其颜色的确定可以按照 *Iscc - NBS* 方法 (K. L. Kelly 和 D. B. Judd. 的“*The Iscc - NBS* 颜色标志方法和颜色名称字典”来进行。U. S. Department of Commerce *Circ.* 553, Washington, D. C, 1955)。

圆括号中的数字表示 *Tresner* 和 *Baekus* 的颜色系列，[H. D. *Tresner* 和 E. J. *Baekus*. 的“关于链霉素分类学的

色轮系统”，AppL MicYobiol. 11 335—338 (1956年)]。其色片标志可以用在其下部划一横线来加以标志。其Maerz和paul颜色组可以用括号括出。(A. Maerz和M.R. paul “颜色字典”，McGraw—Hill Book Company. Inc. New York. N. Y. 1950)

形态 (Morphology)

A—21978.6 培养物的形态包括孢囊柱，该孢囊柱是属于Rectus—Flexibilis (RF) 分类，孢子的每段链长大于10个孢子 (Spore)，孢子的表面柔软。

A—21978.6 培养物是以基本上产生稀薄的红色的孢子群颜色而作为特征的，并具有微淡红色—棕色互相交变的颜色。也存在有微棕色的水溶性的色素。在14种琼脂板培养基中，有三种显示这种特性，这三种培养基 (ISP 2 #，7 #，TPO)，被认为是由空气和营养物而大量生长的一类培养基。

有二种琼脂板培养基，即ISP 4 #和葡萄糖—天门冬酰胺琼脂，产生出一种由白到灰的稀薄的孢子群颜色，并具有交变的黄色，没有观测到其中有水溶性的色素，这二种培养基被认为是较好的培养基，但得到的数量不多，它们是通过空气和营养物而生长。

也利用另外的九种琼脂板培养基，但是它们仅有少量产生，或者不生长，和不形成芽孢。气生的颜色存在时，虽然很少，不过这种气生的颜色都属于由白到灰的颜色系列。

类黑色素色素也不存在，主要是由细胞壁而组成，它们是：LL—二氨基庚二酸，甘氨酸，葡萄糖和核糖。这些都用于类型1细胞壁和类型C糖型来表示 (R. E. Buchanan和N. E. Gibbon, Eds,

“Begey 的细菌学测定手册”，William & Wilkins
Compauny.8fh.Edition 1974.P.658)

下列五种培养物是与 A-21978.6 相比较的实验室试验：

Streptomyces (链霉素) Albovinaceous
ISP 5136; ATcc 15833

Streptomyces (链霉素) Candidus
ISP 5141; ATcc 19891

Streptomyces (链霉素) moderatus
ISP 5529; ATcc 23443

Streptomyces roseosporus
(链霉素) ISP 5122; ATcc 23958

Streptomyces (链霉素) Setonii
ISP 5395; ATcc 25497

这些培养物属于白色和红色颜色系列，具有 RF 型孢囊柱形态，具有光滑的孢子表面，按照 ISP 的说明的，是属于类黑色素负性，没有明显的交替颜色和水溶性色素。这些特征，与碳利用型和其它的第二级特征相结合，都与 A-21978.6 的培养物相符合。

在实验室的条件下，这些培养物与 A-21978.6 相比较时，有四种培养物不合乎要求。S.Candidus 和 S.Setonii 在很多培养基中，表现出气生的黄色孢子群颜色，S.Albovinaceous 和 S.Moderatus 表现出明显的暗的交变的颜色；水溶性色素，并产生出了类黑色素，所有这些，都与 A-21978.6 的培养物不同。由 ISP，表明 S.moderatus 是属于红棕或强烈的棕色交变颜色，而不属于 S.Albovinaceous 一类的特征。这二种培养基都不能

列入黑色素类型。

因而，Falcão de Morias 和 Daliá Maia 于 1961 年把 A-21978.6 培养物分类于 *Streptomyces* (链霉菌) *roseosporus* 菌种。这种分类是以与出版物说明的内容相比较，及直接在实验室进行比较作为基础而得到的，下列列出的培养物的特性即概括了直接比较的研究内容。

培养特性

形态 (Morphology)

A 21978.6	<i>S. roseosporus</i>
观测到孢囊柱直接呈现弯曲形 (属于 RF)，没有观测到钩形，环形和螺形，孢子链长 > 10。用电子显微镜观测到孢子的表面光滑	
孢子：伸长至椭圆	伸长到圆筒形
平均：0.85 × 1.78 μM	1.01 × 2.47 μM
范围：0.65 — 0.97	0.97 — 1.3 × 1.63
× 0.97—2.6 μM	— 3.25 μM

所含有的培养物的特性

<u>A — 21978.6</u>		<u>S. roseosporus</u>	
生长	颜色	生长	颜色
<u>胡萝卜柱</u>			
空气的：	好 灰 C 淡粉	无	无
营养的：	数量多 棕色	好	黄—棕
	没有溶解的色素		无溶解的色素

所含有的培养物的特性

A - 21978.6

S. roseosporus

生长 颜色

生长 颜色

马铃薯柱

空气的: 好 灰 C 淡粉

无 无

营养的: 数量多 棕色

中等 橙-棕

暗棕色溶解的色素

无溶解色素

Isp 1# (胰蛋白株-发酵萃取物琼脂)

空气的: 中等 白色 (W) a

很少 白色 (W) a

营养的: 好 [10A1] 淡黄绿

很少 [10B₂] 淡黄绿

无溶解的色素

无溶解的色素

Isp 2# (发酵-麦芽萃取琼脂)

空气的: 数量多 (R) 5cb gy

数量多 (R) 3Ca 淡橙黄

灰黄, 淡粉

营养的: 数量多 [5D10] It 红

数量多 [12L7] It 橄榄

棕有微棕色溶解色素

棕色有微棕色的溶解色素

Isp 3# (麦片琼脂)

气生的: 中等 白色 (W) a

很少 白色 (W) a

营养的: 中等 淡黄, 淡粉 [10A2]

中等 淡绿灰

微棕色的溶解色素

无溶解色素

Isp 4# (无机盐淀粉琼脂)

气生的: 好 白色 (W) b

好 (R) 3C2 淡橙黄

营养的: 好 淡黄-绿 [10B1]

数量多 [11I5] 灰黄

微棕色溶解色素

无溶解的色素

所含有的培养物特性

A - 21978.6

S. roseosporus

生长

颜色

生长

颜色

Isp 5 # (甘油-天门冬酰胺琼脂)

气生的: 少量 (W) 13ba 紫、白色

中等 白色 (W) b

营养的: 好 [367] 灰黄、淡粉

好 灰黄 [10C2]

淡粉色溶解的色素

微棕色溶解色素

Isp 7 # (酪氨酸琼脂)

气生的: 数量多 黄淡粉 (R) 5Cb

数量多 灰, 黄, 淡粉
(R) 5Cb

营养的: 数量多 红棕 [7L12] mod

数量多 黄-棕 [11E5]

有暗棕色溶解色素

棕色溶解色素

Benneff' 的改进的琼脂

气生的: 无

数量多 灰黄淡粉 (R) 5Cb

营养的: 少 淡黄棕

数量多 灰, 黄 [11D4]

无溶解色素

微棕色溶解色素

苹果酸钙琼脂

气生的: 无

很少 白色 (W) a

营养的: 中等 红棕 [7L12]

很少 淡黄-绿

微棕色溶解色素

淡黄-绿溶解色素

蔡氏 (Czapek) 溶液琼脂

气生的: 很少 白色 (W) a

无

营养的: 很少 无白色

无

无溶解的色素

所含有的培养物特性

A-21978.6

S.roseoporus

生长

颜色

生长

颜色

Emerson 琼脂

气生的：很少
 营养的：数量多 [13L6]
 无溶解的色素

数量多 (R)5Cb 黄、淡粉
 数量多 [1115]g_y黄色
 有微棕色 溶解色素

葡萄糖—天门冬酰胺琼脂

气生的：好 白色 (W)b
 营养的：好 灰黄 [12 b2]
 无溶解色素

中等 白色 (W)b
 好 [12B2]淡黄绿
 无溶解色素

甘油—甘氨酸琼脂

气生的：很少
 营养的：数量多 暗灰·棕 [8L12]
 棕色的溶解色素

数量多 白色 (W)b
 数量多 淡黄 [10G3]
 淡棕色溶解色素

营养琼脂

气生的：无
 营养的：很少 淡黄—灰
 无溶解色素

中等 白色 (W)b
 好 淡黄·灰
 无溶解色素

西红柿—燕麦糊琼脂

气生的：数量多 (R)5cb 灰·黄·粉
 营养的：数量多 [8L12]暗灰·棕
 棕色溶解色素

数量多 (R)5cb 灰·黄·粉
 数量多 [12L7]黄·棕
 棕色溶解色素

碳的利用

S.roseoporus

A-21978.6

基片

L-阿拉伯糖	+	+
D-果糖	+	-
D-半乳糖	+	+
D-葡萄糖	+	+
i-肌醇	-	-
D-甘露糖醇	+	-
D-棉子糖	-	+
L-鼠李糖	+	+
水杨苷	+	-
蔗糖	-	+
D-米糖	+	+

说明: +表示正利用碳

-表示负利用

抗菌素敏感性试验

抗菌素	含量/盘	分类	A-21978.6	S.roseosporus
红霉素	15 μg	大环内酯物	+	+
头孢菌素	30 μg	β-内酰胺	+	+
林肯霉素	2 μg	甘·配糖物	-	-
制霉菌素	100单位	多稀类抗菌素	-	-
多粘菌素	300单位	肽	+	-
链霉素	10 μg	氨基甘·配糖物	+	+
四环素	30 μg	四环素	+	+
万古霉素	30 μg	糖肽	+	+

+ == 敏感 (抑制带)

- == 抗药性 (无抑制区)

特性

类黑色素	-	-
Isp 1# (胰蛋白胨-酵母萃取物)	-	-
Isp 6# (胨-酵母萃取物·铁)	-	-
Isp 7# (酪氨酸琼脂)	-	-
Isp 7# (改进的) (Isp 7#中没有酪氨酸)	-	-
酪氨酸试样	-	-
明胶液化作用	+	+
脱脂乳作用	微量水解	微量水解
淀粉水解	+	+
PH范围	5-11	5-11
温度范围	25-40°C	25-40°C
硝酸盐还原	-	+
耐NaCl性, 生长到:	10%	6%

A-21978.6 菌种的某些特性不同于已知的 *S. roseosporus*。A-21978.6 培养物在孢子大小，胡萝卜和马铃薯柱的生长，防 NaCl 的性质，和在硝酸盐的还原作用等性质方面都和已经公开的菌种不同。

本发明中的 A-21978.65 菌种具有与 A-21978.6 的菌种同样的特性。但是，不同之处在于所生产的 A-21978 C 的抗菌素的总量不同。较早的菌种，每毫升发酵基中所产生的 A-21978 C 抗菌素，最好的也没有超过 100 mcg。而本发明的经过改进的 A-21978.65 的菌种，在罐发酵中所得到的量至少是上述数量的 2.5 倍，而在振荡瓶中的发酵中，已经得到 18 倍于上述数量的产量。具有这种提高产量的 A-21978 C 所产生的特征是，使这种新的菌种能对要得到的各种抗菌素的生产在方法上作出巨大的改进。

和其它的有机体一样，本发明产生的新的 A-21978 C 培养基 *Streptomyces (链霉素) roseosporus* NRRL_____，易发生变异。NRRL_____ 菌种的重组体，变异体和突变体，可以用已知的、不同的诱变原进行处理而得到，例如，紫外线，X-射线，高频波，放射线和化学品等。天然的和经过诱导而得到的 *Streptomyces (链霉素) roseosporus* NRRL_____ 的突变体，变异体和重组体，只要保留了产生 A-21978 C 抗菌素的特性，产量也高，则它们也可以用在本发明中。

用于 *Streptomyces roseosporus* NRRL- - 菌种生长的培养基，可以是培养液中的任何一种培养基。例如，可以使用葡萄糖，果糖，半乳糖，麦芽糖，甘露糖，棉子油，油酸甲酯，甘油，精制大豆油等，然而，就生产的经济性，最佳产率和容易离析等方面来

说，在大范围的发酵过程中，一种最好的碳源却是木薯糊精。

关于氮源，虽然可以利用可溶性的肉胨，大豆粉，大豆水解产物，大豆渣，酵母，氨基酸类像L-天门冬酰氨和DL-亮氨酸等，但是，一种较好的氮源是一种水解酪蛋白酶。

可以与培养基配合使用的无机盐营养物，是可以形成钾，铵，氯化物，硫酸盐，硝酸钾盐等离子的可溶性的盐，其中， K_2SO_4 在抗菌素生产中最有用，糖蜜灰，灰渗析液，和合成的无机混合物等也有用。

生产A-21978 C抗菌素时，在其发酵培养基中最好使用蒸馏水或者去离子水，在自来水中，如果存在如钙和碳酸盐等无机物，则会对抗菌素的生产起阻碍作用。

用于微生物的生长发育所必须的基本微量元素也应该包括在菌种培养基中。这种微量元素一般是在其它培养基的结构中，作为不纯物而存在的，其含量足以满足微生物生长所需要的量。

如果在大范围发酵过程中，发泡作用影响发酵，则必须加入某种少量防泡剂（用量为0.2毫升/每升）如加入聚丙烯乙二醇到发酵培养基中。

大量生产A-21978 C抗菌素，最好在罐内进行，用液内需氧发酵方法。不过，也可以用震动—摇瓶培养法来得到少量的A-21978 C抗菌素。

由于在微生物的生产中，其时间滞后通常与大罐的接种，及微生物的孢子形式有关系，因此，最好是利用某种营养接种物。这种营养接种物是利用孢子形式，或者微生物的菌丝体的断片来接种某种小量的培养物培养基，以得到某种新鲜的、有活性的，微生物菌种生长培

养物，然后再把这种营养物移植到一种大罐中。

这种新产生的 A-21978 C 的微生物，可以在温度为 20°C 和 40°C 之间的温度进行生长培育。A-21978 C 的生长的最适宜的条件为在温度 30°C 到 32°C 为好。

通常，在液内需氧培养的方法中，无菌空气被通过培养物培养基而扩散。为了有效的生产 A-21978 C 的抗菌素，在罐内生产所用的饱和空气的百分含量应该高于 20%，最好是高于 30%（温度为 30°C 和压力为 1 个大气压）

罐内发酵，最好保持发酵培养基的 pH 范围在大约 6.5—7.0。这可以通过加入适当量的如氢氧化钠（在开始步骤）和加入盐酸（在最后步骤）而作到这一点。

A-21978 C 抗菌素产品能在发酵期间，通过测定液体培养液或菌丝体固体提取物样品，用已知对抗菌素过敏的有机体作对比，来测定抗菌素的活度。在测定这些抗菌素时，一种常用的鉴定有机体是黄球菌（*Micrococcus Luteus*）。生物鉴定是通过纸盘在琼脂板上完成的。

另外，培养物固体，包括培养基成分和使用没被提取或分离的菌丝体，但最好是去除水份后，选择来作为 A-21978 C 抗菌素的来源。例如，在 A-21978 C 活性抗菌素的生产之后，培养基能用在真空中的冷冻状态下蒸发水份的方法来干燥，混合后直接进入供给预混合料中。

结构式 I 的化合物是的抗菌素剂。

为了很完全地说明本发明的操作，下面提供了未加限制的例子。

例 一

A-21978 C 复合物的生产

在液氮的汽化相中制备和保存一种原种培养物。Streptomyces roseosporus NRRL _____，在液氮的汽化相中预先给以保存，然后使用 50 毫升的下列组合物的营养培养基进行接种。

成 分	数 量 (%)
胰蛋白酶大豆液体培养基 [Trypticase soy Broth*]	3.0
糊 精	2.5
水 (去离子)	94.5

* Baltimore 生物实验室, Cockeysville MD

接种后的培养基放在一个 250 毫升的锥形瓶中，该烧瓶放在一个二英寸的拱形板的旋转振荡器上，转速为 250 转/分钟，于 30 °C 培养 48 小时。然后将成熟的营养培养物分散到多个 (0.5 毫升) 的容器中，并在液氮的汽化相中储藏。

为了提供大量均匀的供应储存物品，用在液氮中 1 毫升的培养物接种到 80 毫升的上面所讨论的营养培养基上，把接种后的营养培养基放一个 250 毫升的锥形瓶中，该烧瓶放在一个二英寸的拱形板的旋转振荡器上，转速为 250 转/分钟，于 30 °C 培养 48 小时。

用 10 毫升的这种培养物来接种到 450 毫升的有如上面所描述的第一阶段营养培养基相同组成的第二阶段营养生长培养基上。第二阶段的培养基放在一个 2 升的锥形烧瓶中，该烧瓶放在一个 2 英寸的拱形板的旋转振荡器上，转速为 250 转/分钟，于 30 °C，培育 24 小时。

使用 1 升的第二阶段的营养培养物接种到 39 升的有下列成分的无菌的第三个接种物生长培养基上：

成 分	数 量 (%)
大豆蛋白粉 [Soybean Flowr]	0.5
酵母萃取物 ^a	0.5
葡糖酸钙	1.0
Kcl ^b	0.02
MgSO ₄ ·7H ₂ O ^b	0.02
FeSO ₄ ·7H ₂ O ^b	0.004
Sag471 [防泡]	0.03
水	97.9296

a、Difco 实验室，Detroit MI

b、如下面方法来制备微量无机物：

将 FeSO₄·7H₂O (7.6 克) 溶解在经浓缩的 Hcl (76 毫升)，然后加入 MgSO₄·7H₂O (380 克)，Kcl (380 克) 和去离子水使总体积为 3800 毫升，为了提供满意的无机物，使用每 39 升的第三个接种物生长阶段的 80 毫升的溶液。

c、Union Carbide，Danbny CT

接种后的培养基在一个不锈钢容器中于 30°C 培育 24 小时，容器中以 0.85V/V/m 的速度充以无菌空气，并用常规的搅拌器搅拌，转速为 350~450 转/分钟，容器中的压力保持在 5 泊斯卡 (PSIG)。

使用 1 升的培育后的第三个接种体阶段产物来接种到有下列组成的 119 升的无菌产品培养基上：

成 分	数 量 (%)
大豆蛋白粉 [Soybean Flour]	2.2
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.066
葡萄糖	0.825
Sag471	0.022
土豆糊精	3.3
糖浆 (乳化黑色油)	0.275
自来水	93.312

在加入第一、二种成分之后，将 PH 调节到7.0，接着加入所有的成分，立刻消毒灭菌一段时间。

接种后的产品培养基在一个不锈钢容器中，于 30°C 并以 0.5 V/V/m 的速度充以无菌容气，培养6天。培养基用常规的搅拌器搅拌，在速度为250转/分钟时，搅拌0~15小时，和在速度350转/分钟时，搅拌15小时，加入氢氧化胺 ($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 来保持 PH 值等于或超过6.5。在发酵结束时，A-21978 C复合物的产量是每升发酵液体培养液为0.282克，因子分析如表一所描述的。

例 2

增加 A-21978 C₈ 的产量

进行如例1所描述的第一，第二，第三生长步骤。最初的生产步骤除例1描述的之外，开始时含有50% V/V 辛酸 ($\text{C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2$) 和甲基油酸盐的无菌溶液以每小时每升发酵液体培养液0.13毫升的速率供给发酵体28小时，以这个速度，经144小时直到发酵结束。A-21978 C复合物的产量是每升液体培养液1.255克，比例1获得的产量增加445%。因子A-21978 C₈ [结构式I的化合物，

其中R是辛(酰)基]代表用这个方法制备出的总的A-21978 C合成物的9%。在用例1的方法制备出的A-21978 C复合物中没有测出有A-21978 C₈。

例 3

增加A-21978 C₉的产量

进行如例1所描述的第一,第二和第三步培养生长步骤,最初的生产步骤除例1描述的之外,开始时含有25% V/V 壬酸和75% 甲基油酸盐以每小时每升发酵液体培养液0.13毫升的速率供给发酵体28小时,以这个速度时,经144小时直到发酵结束。A-21978 C合成物的产量是每升液体培养液肉汤0.821克,超过例1获得的产量293%。因子A-21978 C₉ [结构式I: R是壬酰基(CH₃(CH₂)₇CO-)]代表用这个方法制备出的总的A-21978 C复合物的10%。在用例1的方法制备出的A-21978 C复合物中没有测出有A-21978 C₉。

例 4

增加A-21978 C₁₀的产量 因子A-21978 C₁₀ [结构式I: R是癸酰基]

进行如例1所描述的第一,第二步营养生长培育步骤,在第三步,使用800毫升的第二步接受体培养物接种到有下列组成的950升的无菌的第三个接受体生长培养基上。

成 分	数 量 (%)
葡萄糖	2.0
碳酸钙	0.2
大豆蛋白粉 (Soybean Flour)	2.0

酵母萃取物	0.1
Kcl ^a	0.02
MgSO ₄ ·7H ₂ O ^a	0.02
FeSO ₄ ·7H ₂ O ^a	0.0004
Sag471 (防泡)	0.02
水	95.6396

a. 如例 1 所描述的方法来制备微量无机物溶液。

经接种后的培养基在一个不锈钢容皿中于 30 °C 培育 24 小时，容器中以 0.8 V/V_m 的速度充以无菌空气并用常规的搅拌器搅拌。用 1 升的这种第三步接受体来接种到 119 升有如例 1 描述的组成的生产步骤培养基上。除了例 1 所叙述的开始步骤之外，在开始了 28 个小时，把一个含有 50% V/V 的癸酸和 50% 的甲基油酸盐的无菌溶液以每小时每升发酵液体培养物 0.26 毫升的速率进入发酵体，保持这个速度，经 283 个小时，直到发酵结束。A-21978 C 复合成物的产量是每升液体培养液 1.94 克，比用例 1 的方法增加 687%。浓缩 A-21978 C₁₀ 因子 (结构式 I: R 是 N-癸酰基) 得每升 1.63 克或总的 A-21978 复合物的 84%，这比用例 1 的方法所得到的 A-21978 C₁₀ 大 13583%。

例 5

增加 A-21978 C₁₀ 产量的另外方法

进行如例 1 所描述的第一，第二和第三个接种体生长步骤。除了最初的生产步骤如例 1 所描述的之外，开始了 28 小时，把一个含有 25% V/V 的辛酸乙基酯 (乙基辛酸酯) 和甲基油酸脂的无菌溶液以每小时每升发酵液体培养液 0.13 毫升的速率加到发酵体中，保持

这个速率，经 144 小时直到发酵结束，A-21978 合成物的产量是每升 1.022 克，比用例 1 方法所得到的产物增加 362%。浓缩 A-21978 C₁₀ 因子是每升 0.202 克或总的 A-21978 C 合成物的 20%。这比用例 1 的方法所生产的浓缩 A-21978 C₁₀ 的产量大 1683%。

例 6

增加 A-21978 C₁₀ 产量的另外方法

进行如例 1 所描述的第一，第二步营养生长培养步骤。除了第三步接受体如例 4 所描述的培养之外，培养基的体积是 1900 升，这一步骤持续 48 个小时。从 0~24 小时充气速率为 $0.3V/V/m$ ，从 24~40 小时，充气速率为 $0.45V/V/m$ ，从 40~48 小时，充气速率为 $0.90V/V/m$ 。最初的生产步骤如例 1 所描述的。在 23 小时之内，把 0.004% 的酵母萃取物的无菌悬浮液成批供给发酵体。开始 36 小时，丙三醇和癸酸铵溶液以每小时每升发酵液体培养液 0.84 毫升的速率供给。供给的溶液含有丙三醇 (3600 克)、去离子水 (9000 毫升)、辛酸 (1 升) 和浓缩的氢氧化胺溶液 (620 毫升)。在这个速率下保持供给 143 小时，直到发酵结束。A-21978 C 合成物的产量是每升 1.772 克，比用例 1 方法获得的产品产量增加 628%，浓缩 A-21978 C₁₀ 因子经测定是每升 0.739 克或是总的 A-21978 C 合成物的 42%，这比用例 1 方法生产的浓缩 A-21978 C₁₀ 的产量大 6158%。

例 7

增加 A-21978 C₁₁ 的产量

进行如例 1 所描述的第一，第二和第三个接种步骤。除了最初的

生产步骤如例 1 描述的之外，开始 28 个小时内，一个含有 25% V/V 十一烷酸和 75% 的甲基油酸盐的无菌溶液以每小时每升发酵液体培养液 0.13 毫升的速率加到发酵体中，在 144 小时内直到发酵结束。A-21978 C 合成物的产量是每升 1.62 克，这比用例 1 方法所得到的 A-21978 C₁₀ 的产量高 574%。浓缩 A-21978 C₁₁ 因子〔结构式 I：R 是十一酰基〕经测定是每升 0.70 克，或是总的 A-21978 C 复合物的 43%。在通过用例 1 方法制备的 A-21978 C 复合物中没有发现 A-21978 C₁₁ 因子。

例 8

增加 A-21978 C₅ 的产量

进行如例 1 所描述的第一，第二和第三步接种步骤，除了最初的生产步骤如例 1 描述的之外，在开始的 28 个小时之内，一个含有 25% V/V 的十二烷酸和 75% 甲基油酸盐的无菌溶液以每小时，每升发酵液体培养液 0.13 毫升的速率加入到发酵体中，在 144 小时内直到发酵结束。A-21978 C 合成物的产量是每升 1.12 克比用例 1 的方法产品增加 400%，浓缩因子 A-21978 C₅〔结构式 I：R 是十二烷酰基〕经测定是每升 0.372 克或是总的 A-21978 C 复合物的 33%。这比用例 1 方法制备的 A-21978 C 合成物中发现的浓缩 A-21978 C₅ 大 5314%。

例 9

生产 A-21978 C 合成物的其它方法

使用例 1 的方法制备 A-21978 C 复合物，但使用 *Streptomyces reeseosporus* NRRL 11379 培养物。

例 10

增加 A-21978 C₁₀ 产量的其它方法

使用例 6 的方法制备 A-21978 C₁₀，但使用 *Streptomyces roseosporus* NRRL 11379 培养物。

例 11

振荡瓶生产的 A-21978 C 合成物

使用如例 1 描述的一般方法，但在振荡瓶条件下，使用下列发酵培养基：

成 分	数 量 (%)
葡萄糖	7.5
糊精 ^a	30
酶水解酪蛋白 ^b	5
陈 ^c	5
糖浆	2.5
去离子水	总量为 1 升

a、Stadex 11, A, E, Staleyco, Decatur IL

b、NZ Amine A, Humko Shebbled chemical
Lyndurst NJ

c、Biosate, Baltimore Biological labor-
atories, Coekeysville MD

从这个发酵体中得到的 A-21978 C 合成物的产量是每升液体培养物 1800 mcg。

表 1 不同的脂肪性基质对生产 A-21978C 组成的影响

A-21978C 组成 (毫克/毫升) ^{a, b}

例子	类酯性基质	C ₁	C ₂	C ₃	C ₅	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁
1	无	77	113	72	7	/	/	12 ^c	/
2	辛酸	276	312	214	175	113	/	170	/
3	壬酸	147	177	125	192	/	83	90	/
4	癸酸	135	50	48	77	/	/	1630 ^d	/
5	癸酸乙基酯	168	246	156	251	/	/	202 ^d	/
6	癸酸铵	335	371	228	98	/	/	739 ^d	/
7	十一烷酸	163	206	158	273	/	/	118	700
8	十二烷酸	204	236	141	372	/	/	173	/

a、在过滤后液体培养液里抗菌素组成的浓度用高性能的液体色谱法来评价，不同的组成通过紫外光吸收来测定。

b、C₀，C₁，C₂，C₃和C₅是天然发生的A-21978C因子；C₈，C₉，C₁₀和

C₁₁是结构式I的化合物，其中R=C₈，C₉，C₁₀和C₁₁分别代表酰基基团。

c、自然因子C₀。

d、实际上发现R是N-癸酰基。

勘 误 表

CPCH856660

文件名称	页	行	补 正 前	补 正 后	
权利要求书	2	1 3	NRRL _____ ,	NRRL <u>15998</u> ,	
		1 6	"	"	
说明书	3	1 4	或者。	或重组体。	
		倒 5	抗菌素 ,	复合物 ,	
		5	NRRL _____ ,	NRRL <u>15998</u> ,	
		8	"	"	
		3	1 3	"	"
	说明书	5	1 8	"	"
			倒 2	"	"
		6	2	"	"
			1 3	"	"
		9	8	Flexibililis	Flexibililis
		18	1 4	NRRL _____ ,	NRRL <u>15998</u> ,
			1 5	"	"
			1 8	"	"
			2 1	"	"
		21	4	"	"
22	9	0.004	0.0004		
23	倒 5	(GH ₁ , 100H)	(C ₇ H ₁ , COOH)		
26	1	A-21978	A-21978C		