

NOVÉ SPÔSOBY BIOSYNTETICKEJ VÝROBY ANTIBIOTÍK (I) VÝROBA TECHNICKÉHO CHLÓRTETRACYKLÍNU

E. BĚLÍK, M. HEROLD, M. HUDEC, J. MIŠEČKA, J. ZELINKA

Pokusné pracovisko kukuričného výluhu Slovenských škrobární, n. p., Boleráz
Výskumný ústav antibiotík v Roztokách pri Prahe

Všetky hĺbkové fermentácie antibiotík sa na celom svete robia na základe pôvodného riešenia biosyntetickej výroby penicilínu. Pritom je známe, že pri fermentácii penicilínu jednou z hlavných podmienok dobrého priebehu produkcie antibiotika je sterilita pôdy pred očkovaním a dokonalá ochrana kultúry pred cudzou mikroflórou počas kultivácie [1]. Uskutočnenie biosyntetickej výroby penicilínu vo veľkých objemoch za dodržania sterilných podmienok priebehom fermentácie bolo svojho času priamo revolučným skokom v kvasnom priemysle a umožnilo obrovský rozmach výroby penicilínu v rokoch 1945—1948. V priemyselne vyspelých štátoch bola v týchto rokoch vybudovaná veľká fermentačná kapacita pre výrobu penicilínu. Neustále zvyšovanie výťažnosti výroby, ktorá bola daná predovšetkým vývojom vysokoprodukčných kmeňov, zdokonalením technológie a stupňovaním výťažkov izolácie viedlo však k tomu, že výrobná kapacita penicilínových závodov sa stala nadmernou a bolo nevyhnutné využiť ju pre iné fermentácie. Táto okolnosť podstatne prispela k neobyčajne rýchlemu zavedeniu ďalších novoobjavených antibiotík do výroby vo veľkom rozsahu. Tým sa stalo, že fermentačná technológia a aparátúra výroby penicilínu bola bez zmeny, možno povedať takmer mechanicky prevedená na výrobu nových antibiotík, napríklad streptomycínu v rokoch 1946—1947.

Dodržanie absolútnej sterility pôdy pred očkovaním a dokonalá ochrana pôdy pred cudzou mikroflórou priebehom celej doby fermentácie zostávali stále dominantnou požiadavkou pri konštrukcii fermentačných kadí, a to i pri výrobe antibiotík so širokým spektrom účinnosti [8].

Zistili sme, že chlórtetracyklín nie je nevyhnutné vyrábať za dodržania požiadaviek sterility [2]. V pôvodnej práci [3] sme experimentálne v rade pokusov fermentovali bez dodržania podmienok sterility. Ďalej sme fermentačné pôdy zámerne kontaminovali baktériami, kvasinkami i prírodným materiálom, napr. silne znečistenou riečnou vodou alebo zeminou. Zistili sme, že i zámerná kontaminácia nespôsobila zníženie produkcie chlórtetracyklínu. Na základe získaných laboratórnych výsledkov sa uskutočnil rad fermentácií chlórtetracyklínu a oxytetracyklínu v drevených 100 litrových kadiach bez dodržania podmienok sterility [4].

Vzali sme si preto za úlohu vypracovať nové biosyntetické postupy na výrobu antibiotík vo väčších objemoch. V tejto práci referujeme o pokusnej výrobe chlórtetracyklínu.

Experimentálna časť

Kmeň. Použili sme produkčný kmeň *Streptomyces Aureofaciens* Bg a *Streptomyces aureofaciens* BM-K.

Spórový materiál vysušených kmeňov sa pripravil vyočkovaním raz mesačne z pieskovej konzervy na sporulačnú pôdu č. 16 tohto zloženia: sacharóza 0,3 %, dextrín 1,5 %, močovina 0,01 %, NaCl 0,05 %, K_2HPO_4 0,05 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 %, peptón 0,5 %, mäsový extrakt 0,1 %, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 %, agar 3 % a destilovaná voda. pH pred sterilizáciou bolo 7,2. Pôda sa rozliala do Endových skúmaviek po 25 ml, sterilizovala 40 minút pri 1,1—1,2 atp a zošikmila sa [3]. Kondenzovaná voda v Endových skúmavkách sa vysušila 5—7 dňovým uchovávaním pri teplote 28 °C. Po naočkovaní sa kultivovala 10 dní pri teplote 28—30 °C. Po kultivácii sa Endove skúmavky uložili do chladničky pri +5 °C a používali sa najviac do jedného mesiaca.

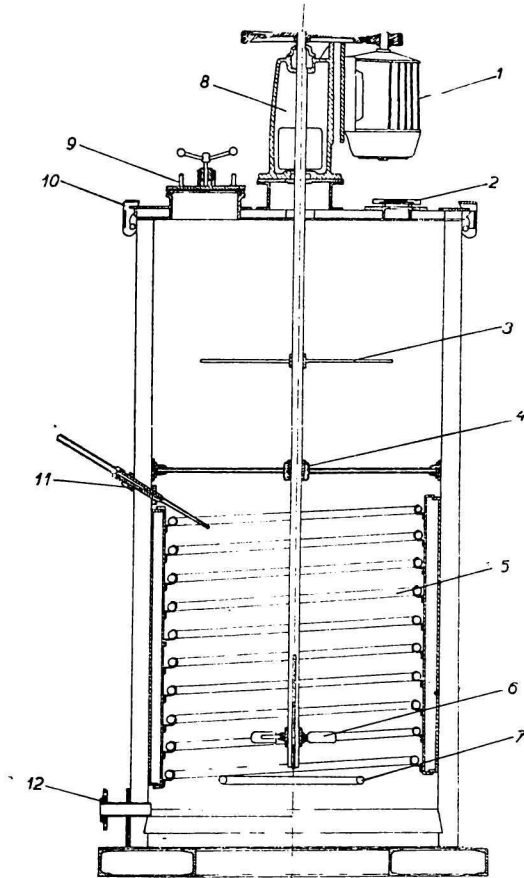
Vegetatívne inokulum sme pripravili na rotačnej trepačke (180 ot/min, pri excentricite 5,5 cm) v 500 ml varných bankách s obsahom fermentačnej pôdy č. 8/8 tohto zloženia: sacharóza 3 %, sójová múka 2 %, NaCl 0,5 %, $CaCO_3$ 0,4 %, $(NH_4)_2SO_4$ 0,2 %, melasa 0,2 % a kukuričný výluh (60 % sušiny) 0,5 %. pH sme 20 %-nou H_2SO_4 upravili na 5,8. Pôdu sme rozliali po 60 ml do 12 baniek a sterilizovali 40 minút pri 1,1—1,2 atp. Po vysterilizovaní mala pôda pH 6,6—6,8. Z týchto baniek sme jednu banku naočkovali jednou kľučkou spór a 24 hodín kultivovali pri teplote 28—30 °C. Taktó získanou prvou generáciou sme naočkovali ostatné banky à 3 ml tohto inokula. Banky sme tak isto kultivovali na rotačnej trepačke pri 28—30 °C. Po 24 hodinách kultivácie sme 6 baniek odobrali z trepačky, zliali sterilne do 2 baniek a uložili do chladničky. Ostatné banky sme kultivovali do dosiahnutia maximálnej produkcie antibiotika (4. deň) a použili na stanovenie sterility a produkcie. Po vyhovujúcom sterilitnom a produkčnom teste sme banky z chladničky použili na inokuláciu očkovacieho tanku.

Príprava inokula v očkovacom tanku

V pokusnej prevádzke sme inštalovali 100 litrový očkovací tank z nehrdzavejúcej ocele. Tank je vybavený propelerovým miešadlom, prevzdušňovacím vencom, výhrevným a chladiacim duplikátorom, mechanickým odpeňovačom upevneným na hriadelí a bežnou potrebnou armatúrou [5]. Na zaočkovanie 60 litrov vysterilizovanej fermentačnej pôdy č. 8/8 (120 °C po dobu 40 minút) sa použil obsah jednej banky z chladničky. V očkovacom tanku sme kultivovali za nepretržitého miešania (370 ot/min) a prevzdušňovania (30 l/min) pri kultivačnej teplote 28—30 °C po dobu 24—28 hodín podľa kvality inokula. Inokulum sme v laboratóriu, ako aj v očkovacom tanku pripravili za dodržania sterility.

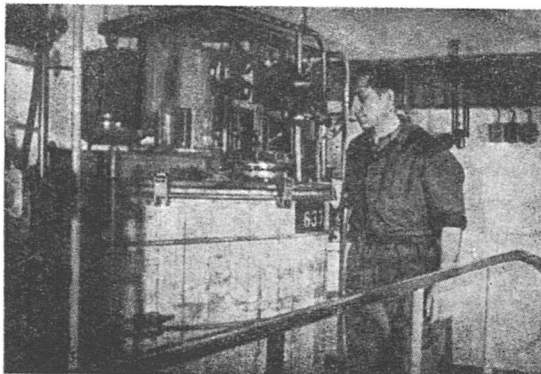
Fermentácia v drevených kadiach

Vlastnú fermentáciu sme uskutočnili v drevených kadiach o obsahu 2000 litrov. Drevené fermentačné kade sme vybavili miešadlom, prevzdušňovacím vencom, výhrevnými a chladiacimi hadmi a mechanickým odpeňovačom (obr. 1 a 2). Fermentačnú pôdu zloženia 8/8 (1000 litrov) sme iba povarili 40 minút a po ochladení na kultivačnú teplotu 28—30 °C sme ju zaočkovali celým obsahom pripraveného inokula v očkovacom tanku. Kultivovali sme za ustavičného miešania (150 ot/min) a prevzdušňovania polovičným objemom (500 l/min) po dobu 45—50 hod. Počas fermentácie sme sledovali priebeh základného metabolizmu.



Obr. 1. Fermentačná kaďa.

1. elektromotor, 2. pozorovacie sklo, 3. mechanický odpeňovač, 4. ložisko hriadela miešadla, 5. vyhrievací a chladiaci had, 6. miešadlo, 7. prevzdušňovací veniec, 8. prevodová skriňa, 9. prielez, 10. uzáver horného vrchnáka nádrže, 11. objímka na teplomer, 12. výtokové potrubie.



Obr. 2.

Filtrácia pôdy

Po dosiahnutí maximálnej produkcie antibiotika sme do pôdy pridali 0,1 % CaCO_3 a sfiltovali na vákuovom rotačnom filtri typu Door-Oliver. Ako filtračnú vrstvu sme použili zemiakový škrob [7]. Na škrobovej vrstve zachytené časti vyfermentovanej pôdy sme odrezávali posuvným nožom.

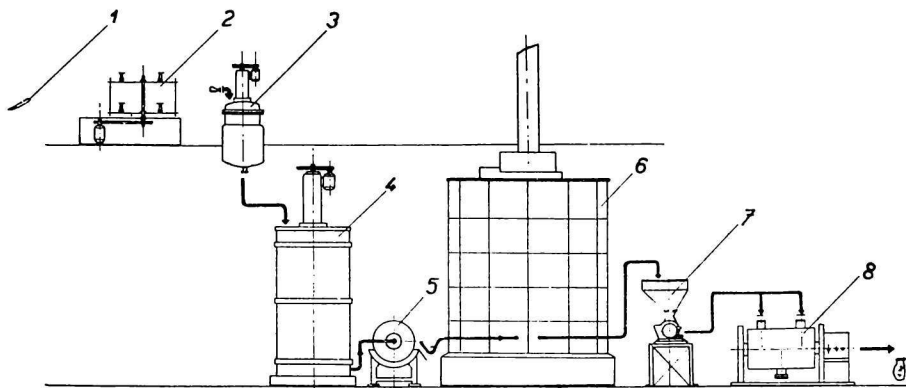
Sušenie preparátu

Odfiltrovaný vlhký materiál sme vysušili v elektrickej skriňovej sušiarňi pri maximálnej teplote 60 °C.

Mletie a konečná úprava preparátu

Vysušený preparát sme rozpráškovali na kamennom mlyne, zhomogenizovali a stanovili v ňom obsah chlór-tetracyklínu. Na základe stanovenia chlór-tetracyklínu sme homogenizáciou uskutočnili konečnú úpravu preparátu na štandardný obsah 10 000 γ CTC/1 g. Ako riedidlo sme použili zomleté výpalky kukuričnej škrobárne. Homogenizovali sme v rotačnom homogenizátore.

Technologický postup je zrejmy zo schémy výroby na obr. 3.



Obr. 3. Schéma výroby technického chlór-tetracyklínu.

1. Endova skúmavka, 2. rotačná trepačka, 3. očkovací tank, 4. fermentačná káď,
5. vákuový filter, 6. sušiareň, 7. mlyn, 8. homogenizátor.

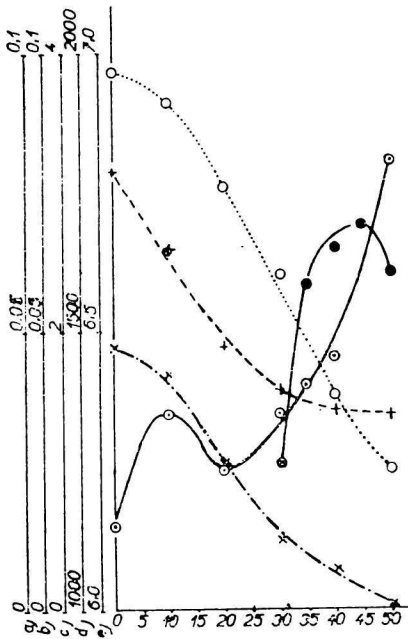
Kontrolné a analytické metódy

Sterility sme uskutočnili v tekutých bujónoch a na krvnom agare. Chlór-tetracyklín v produkčných pôdach a v hotovom produkte sme stanovili kolorimetricky [6], celkový dusík metódou Kjeldahlovou, aminodusík podľa Sørensen, cukry po inverzii modifikovanou Bertrandovou metódou [9], hodnoty pH ionoskopom.

Priebeh základného metabolizmu znázorňuje obr. 4, z ktorého je zrejmé, že biosyntéza chlór-tetracyklínu prebieha rýchlejšie ako za prísne sterilných podmienok. V priebehu rokov 1956—1957 dosiahli sme produkciu chlór-tetracyklínu vo fermentačných kadiach

pri bezporuchovej prevádzke s kmeňom *Streptomyces aureofaciens* Bg 700—1100 γ CTC/ml, s kmeňom *Streptomyces aureofaciens* BM-K 1500—2100 γ CTC/ml priebehom 48—50 hod. kultivácie.

Ďakujeme všetkým pracovníkom národných podnikov Slovenské škrobárne v Boleráze a Penicilín v Rostokách pri Prahe, ktorí aktívne pomohli pri budovaní pokusnej prevádzky. Ďalej ďakujeme za mimoriadne porozumenie a aktívnu pomoc riaditeľovi Hlavnej správy Povereníctva potravinárskeho priemyslu a výkupu poľnohospodárskych výrobkov s. Gécimu a za projekčné práce konštruktérovi Vyskumného ústavu antibiotík s. Mrvovi.



Obr. 4.

-○..... red. látky
- γ CTC
- ×----- aminodusík
- +----- celkový dusík
- pH
- a — aminodusík g/100 ml filtrátu
- b — celkový dusík g/100 ml filtrátu
- c — red. látky ako glukóza g/100 ml filtrátu
- d — γ CTC/ml filtrátu
- e — pH

Súhrn

V priebehu jedného a pol roka nepretržitého chodu pokusnej výroby sme potvrdili správnosť výsledkov biosyntézy chlór tetracyklínu za nesterilných podmienok.

Produkcia dosiahnutá našim novým postupom s kmeňom *Streptomyces aureofaciens* Bg je 700—1100 γ CTC/ml, s kmeňom *Streptomyces aureofaciens* BM-K je 1500—2100 γ CTC/ml, pričom biosyntéza chlór tetracyklínu prebieha rýchlejšie ako za prísne sterilných podmienok.

Na základe dosiahnutých výsledkov budujú sa v ČSR ďalšie zariadenia na výrobu technických antibiotík.

НОВЫЕ СПОСОБЫ БИОСИНТЕТИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА АНТИБИОТИКОВ (I) ПРОИЗВОДСТВО ТЕХНИЧЕСКОГО ХЛОРТЕТРАЦИКЛИНА

Е. БЕЛИК, М. ГЕРОЛЬД, М. ГУДЕЦ, Я. МИШЕЧКА, Я. ЗЕЛИНКА

Опытная станция для исследования кукурузного экстракта Словацкого крахмального завода г. з. в Болеразе

Исследовательский институт антибиотиков в Розтоках у Праги

Выводы

В объеме опытного производства в течении одного и полгода постоянного хода этого производства мы подтвердили правильность результатов биосинтеза хлортетрациклина в нестерильных условиях.

Нашим новым способом полученная продукция при помощи рода *Streptomyces aureofaciens* Bg представляет 700—1100 γ CTC/мл, при помощи рода *Streptomyces aureofaciens* BM-K 1500—2100 γ CTC/мл, при чем биосинтез хлортетрациклина идет быстрее, чем при точно стерильных условиях.

На основании полученных результатов в ЧСР строятся дальнейшие объекты для производства технических антибиотиков.

Поступило в редакцию 23. 8. 1957 г.

NEUE ARTEN DER BIOSYNTHETISCHEN ERZEUGUNG VON ANTIBIOTICA (I). ERZEUGUNG TECHNISCHEN CHLORTETRACYCLINS

E. BĚLÍK, M. HEROLD, M. HUDEC, J. MIŠEČKA, J. ZELINKA

Versuchsarbeitsstätte für Maisquellwasser der Slowakischen Stärkefabriken,
Nationalunternehmen in Boleráz

Forschungsinstitut für Antibiotica, Roztoky bei Prag

Zusammenfassung

Im Umfang einer Versuchserzeugung bestätigten die Autoren im Verlauf eines andert-halb-jährigen Ganges dieser Erzeugung die Richtigkeit der Ergebnisse der Biosynthese von Chlortetracyclin unter nicht sterilen Bedingungen.

Die erreichte Produktion nach diesem neuen Verfahren der Autoren mit dem Stamm *Streptomyces aureofaciens* Bg beträgt 700—1100 γ CTC/ml, und mit dem Stamm *Streptomyces aureofaciens* BM-K 1500—2100 γ CTC/ml, wobei die Biosynthese des Chlortetracyclins unter diesen nicht sterilen Bedingungen rascher verläuft als unter streng sterilen.

Auf der Grundlage der erzielten Ergebnisse werden in der ČSR weitere Kapazitäten für die Erzeugung technischer Antibiotica aufgebaut.

In die Redaktion eingelangt den 23. 8. 1957

LITERATÚRA

1. Beesch S. C., Shull G. M., Ind. Eng. Chem. 47, 1857—1875 (1955). — 2. Bělík E., Herold M., Doskočil J., Čs. patent PV 1482 (1955). — 3. Bělík E., Herold M., Doskočil J., Čs. mikrobiologie 2, 30—35 (1957). — 4. Bělík E., Herold M., Doskočil J., Čs. mikrobiologie (v tlači). — 5. Herold M. a kolektiv, *Antibiotika*

(sborník), Praha 1955. — 6. Levine J., *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.* 38, 473 (1949). — 7. Severa Z., Bělík E., Herold M., Pecák V., Čs. patent PV 1516 (1955). — 8. Van Dyck, de Sommer, USA patent 2 609 329, 2 516 080, 2 653 899. — 9. Zelinka J., Jakab J., Zapletal J., *Chem. zvesti* 10, 536—542 (1956).

Došlo do redakcie 23. 8. 1957