PRESLIA 1956
28: 98—101

KRÁTKÁ SDĚLENÍ

Františka Palečková a Jaromír Šlechta:

Biosynthesa allylmerkaptomethyl-penicilinu.

(Výzkumný ústav antibiotik, Roztoky u Prahy.)

Nepříjemnou skutečností při therapii penicilinu je výskyt určitého procenta pacientů alergických na penicilin G. Jednou z cest, jak lze zabránit vzniku alergických reakcí při léčbě penicilinem, je použití O-penicilinu, t. j. allylmerkaptomethyl-penicilinu. Tento penicilin vzniká biosyntheticky při prekursorování allylmerkaptooctovou kyselinou (1, 2, 3).

Z předběžně otestovaných synthetických půd jsme pro naši práci vybrali půdu Singhovu (4). Na této půdě byl testován kmen *Penicillium chrysogenum* Q 176 a nepigmentující 47-1564/53 při dávkování prekursoru 0,01—0,05 %. Bylo zjištěno, že pro produkci vyhovuje kmen Q 176 a optimálních výsledků je dosaženo při prekursování 0,04 % allylmerkaptooctové kyseliny neb ekvivalentním množstvím allylmerkaptooctanu sodného. O asimilaci prekursoru jsme se přesvědčovali srovnáváním s neprekursorovanou půdou; na synthetické půdě s kmenem Q 176 při prekursorování 0,05 % allylmerkaptooctanu sodného činila produkce 242 % neprekursorované kontroly. Fermentováno bylo jednostupňově za obvyklých podmínek na reciproké třepačce. Stanovení jednotek a chromatografické analysy byly prováděny normálním způsobem na *Bacillus subtilis* SDPC 1—220.*) Dále bylo testováno vhodné složení corn-steepové půdy, při čemž původní množství laktosy (2 %) zůstávalo nezměněno a množství corn-steepu se pohybovalo v rozmezí 3—1 %. Prekursoru bylo použito jako při půdách synthetických. Vyrovnané a optimální výsledky dávala půda složení: 2 % corn-steepu, 2 % laktosy, 0,2 % $CaCO_3$ a to 190 % kontroly (271 j/ml).

Z chromatografických výsledků je patrné zvýšené procento G-penicilinu (38 % kontroly proti 63 % z půdy prekursorované). Jelikož však při prekursorování allylmerkaptooctovou kyselinou není důvodu pro zvyšování procenta benzyl-penicilinu, je možno míti za to, že zvýšení přísluší allylmerkaptomethyl-penicilinu.

Laboratorní výsledky byly přeneseny do poloprovozního měřítka. Schema fermentace však bylo z technických důvodů odlišné od normálního postupu. Bylo fermentováno dvoustupňově: spory—očkovací tank—produkční tank. Tento postup byl ověřen srovnáním produkcí jako vyhovující. Složení půdy bylo převzato z laboratoře, prekursorování sodnou solí allylmerkaptooctové kyseliny bylo prováděno obdobně jako při normálním prekursorování fenylacetamidem, t. j. 5 dávek v pravidelných intervalech během fermentace. Množství allylmerkaptooctové kyseliny bylo voleno ekvivalentní fenylacetamidu. Fermentace na této půdě a za těchto podmínek byly atypické a vý-

*) Biologické stanovení jednotek provedl J. Hess se sp., chromatografická stanovení J. Bialá.

těžky ve srovnání s fermentacemi prekursorovanými fenylacetamidem byly nízké. Domnívali jsme se, že tyto výsledky by mohly být způsobeny změněným poměrem N : C. Upravili jsme proto půdu tak, že úměrně se snížením obsahu corn-steepu jsme snížili i obsah laktosy. Kontrolní fermentace na této „zředěné půdě" s prekursorem fenylacetamidem dávaly v průměru tytéž výtěžky jako na půdě normální. Prvá fermentace O-penicilinu na takto upravené půdě byla uspokojivá, produkce dosáhla cca 60 % kontrolní fermentace G-penicilinu. Další fermentace O-penicilinu byly však postupně nižší, což bylo vysvětlováno tím, že nevhodným skladováním allylmerkaptooctové kyseliny vznikají patrně toxické látky. Domněnka byla ověřena fermentací, kde byl použit čerstvě předestilovaný prekursor a produkce dosáhla cca 80 % kontroly. V nafermentovaných půdách byl stanoven O-penicilin chromatograficky; obsah O-penicilinu se pohyboval mezi 60—90 %, souzeno z velikosti inhibičních zon v místě benzyl-penicilinu.

Provedenými pokusy bylo získáno nezbytné množství preparátu pro klinické zkoušky.

Literatura.

1. — — : Antibiotics; Penicillin O, Man. Chem. 25 : 259—260 (1954).
2. Behrens O. K. se sp.: Biosynthesis of Penicillins. IV. New crystalline biosynthetic Penicillins. J. Biol. Chem. 175 : 793—807 (1948).
3. Ford J. H. se sp.: Penicillin O. Antib. & Chemoth. 3 : 1149—1153 (1953).
4. Singh K. se sp.: Evaluation of Precursors for Penicillin. J. Bact. 56 : 339—355 (1948).

Jan Nečásek a František A. Lokvenc:

Laboratorní fermentace oxytetracyklinu.

(Výzkumný ústav antibiotik, Roztoky u Prahy)

Oxytetracyklin (obchodní značka Terramycin) je kromě druhu *Streptomyces rimosus* (1) produkován také druhem *Streptomyces platensis* (2), *Streptomyces griseoflavus* (3) a *Streptomyces armillatus* (4). Další z popsaných produkčních kmenů S. 942 (5) je pravděpodobně totožný s druhem *Streptomyces armillatus*. Specifikace těchto druhů a kmenů je značně pochybná.

Podle údajů patentové literatury je fermentace oxytetracyklinu prováděna obdobně jako fermentace ostatních antibiotik z aktinomycet na půdách základního složení glukosa-sojová mouka nebo olej-sojová mouka.

Pro výzkum a vývoj fermentace oxytetracyklinu jsme zvolili kmen *Streptomyces rimosus* 0—4. Ze širokého souboru sporulačních půd se v zásadě osvědčil masopeptonový agar s uhlohydrátem a Emersonův agar. Na prakticky všech ostatních, jiných kultivačních půdách, se kterými jsme pracovali, docházelo sice k dobrému nárůstu, ale nikoliv ke sporulaci. Prozatím dáváme přednost masopeptonovému agaru s 1 % laktosy. Sporulační schopnost našeho kmene je na této půdě mimořádně citlivá na kvalitu surovin použitých k její

přípravě. Na tomto mediu tvoří kultura nepříliš silnou pokrývku se šedobílým vzdušným myceliem a středně bohatou tvorbou spor. Typické je rozpraskávání starších kultur. Isolované kolonie tvoří nejprve radiální vrásy a později hvězdicovitě praskají. Kultury produkují na většině půd rozpustný hnědožlutý pigment.

Pro konservaci kmene se nám prozatím osvědčuje obvyklé uchovávání spor v pískových konservách, očkovaných suspensí spor. Máme však za to, že uvedený kmen je i na tento způsob konservace značně citlivý. Tak jsme na př. v jedné šarži vyrobených konserv zjistili, že asi $^1/_3$ z nich dávala produkci několikráte nižší než konservy ostatní, jejichž produkce se pohybovala v obvyklé výši. S tímto poklesem produkční schopnosti byla spjata i pronikavá změna charakteru nárůstu.

Jako fermentačních půd jsme použili medií těchto typů: P—1 (sojová mouka-glukosa-kukuřičný extrakt); P—2 (sojová mouka-škrob-kvasniční lysát-dusičnan sodný); P—3 (kukuřičný extrakt-glukosa-sojová mouka-síran amonný); P—4 (glukosa-sojová mouka-sušené kvasnice); P—5 (sojová mouka-kukuřičný extrakt-sojový olej). Kromě těchto půd, jejichž složení je uvedeno v patentové literatuře, jsme pracovali na půdách: PS (kukuřičný extrakt-glukosa-síran amonný-sojová mouka); P/2 (kukuřičný extrakt-glukosa-sojová mouka); ARA II (glukosa-sojová mouka-síran amonný-melasa); SD (glukosa-škrob-kukuřičný extrakt). S těmito půdami máme dobré zkušenosti při fermentaci jiných antibiotik z aktinomycet a pro fermentaci oxytetracyklinu jsme je vhodně modifikovali. Kromě uvedených základních látek obsahují tyto půdy složky ústojné, event. prakticky neasimilovatelné minerální sole.

Submersní kultivace byly prováděny na reciprokém třepacím stroji při 28 °C ve varných baňkách o obsahu 500 ml. Do baněk bylo rozplňováno po 80 ml živné půdy.

Prakticky na všech půdách počíná velmi brzo fragmentace mycelia, takže zpravidla již v 48. hodině nebo nejpozději v 72. hodině fermentace je kultura převážně tvořena myceliálními fragmenty. Typické spirály hyf lze pozorovat pouze v preparátech z tuhých půd. I na tekutých půdách však nastává v raném období nárůstu stáčení nebo zakřivování hyf.

Po stránce produkční bylo na půdách PS, ARA II a P—5 dosaženo pouze stopových produkcí, na půdách P—1, P—2, P—3, P—4 a P/2 pak produkcí 200—400 mcg/ml. Nejvyšších produkcí bylo dosaženo na půdě SD o základním složení glukosa-škrob-kukuřičný extrakt-síran sodný, kde byla dále s výhodou glukosa nahrazena hydrolem, t. j. zahuštěnými matečnými louhy, odpadajícími při výrobě glukosy. Na této půdě jsou dosahovány průměrné produkce 1000 až 1200 mcg/ml.

Obsah antibiotika ve fermentační půdě je sledován difusní plotnovou methodou s B. subtilis ATCC 6633 jako testujícím mikrobem. Pracovní postup je v hlavních rysech stejný jako postup biologického stanovení chlortetracyklinu (6).

V zásadě se osvědčuje dvoustupňová laboratorní fermentace, kde je kultivační půda v obou stupních totožná. Baňku pro přípravu vegetativního inokula je možno očkovati buď sporami ze šikmého agaru anebo pískovou konservou. Fermentační baňky jsou očkovány 5 % vegetativního inokula.

V programu další práce je zdokonalení předpisu pro přípravu fermentační půdy. Máme za to, že na produkci antibiotika se bude význačně uplatňovati zejména obsah stopových prvků. Dalším krokem bude vypracování optimálního způsobu laboratorní kultivační techniky. Po této stránce jsme zatím nezjistili nutnost zásadních odchylek od obvyklého fermentačního postupu.

Literatura.

1. Angl. pat. 684.417 (1952).
2. Angl. pat. 713.795 (1954).
3. Waksman S. A. and Lechevalier H. A.: Actinomycetes and their antibiotics. Williams and Wilkins, N. Y., 1953.
4. Mancy-Courtillet D. et Pinnert-Sindico S.: Une nouvelle espèce de Streptomyces: Streptomyces armillatus. Ann. Inst. Past. 87 : 580—584, 1954.
5. Franc. pat. 1,084.203 (1955).
6. Hess J.: Dosud nepublikováno.