



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ OPIS PATENTOWY

Nr 42265

Kl. 6 b, 16/03

Société des Usines Chimiques Rhône-Poulenc

Paryż, Francja

Sposób wytwarzania spiramycyny III i (lub) spiramycyny II albo ich mieszaniny

Patent trwa od dnia 19 marca 1958 r.

Pierwszeństwo: 19 kwietnia 1957 r. dla zastrz. 1; 23 lutego 1958 r. dla zastrz. 2 (Francja).

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania spiramycyny III i (lub) spiramycyny II albo ich mieszaniny.

Wiadomo, że spiramycyna, antybiotyk złożony z trzech składników, o właściwościach bardzo zbliżonych, spiramycyny I, II i III, wytwarzana jest przez hodowlę streptomyces ambofaciens (którego szczep został złożony w N.R.R.L. w Peorii, Illinois, Stany Zjednoczone Ameryki, gdzie został oznaczony znakiem NRRL 2420) lub jego mutanty w odpowiednim podłożu hodowli.

Dokładna budowa tych spiramycyn nie jest jeszcze z całą pewnością znana, lecz wiadomo (Paul & Teheltechoff - Bull. Soc. Chim. France str. 443, 1957), że spiramycyny II i III są pochodnymi spiramycyny I, jedna acetylową, a druga propionylową, wiadomo również, że spiramycyny II i III można krystalizować, co uła-

twia ich oczyszczanie i stanowi ważną zaletę przy stosowaniu farmaceutycznym.

Drugą zaletą spiramycyn II i III jest ich mała toksyczność, co wynika z podanej niżej tablicy, w której podano dawki w g/kg trzech spiramycyn, powodujące śmierć 50% myszy (DL₅₀ g/kg s. c.) przy zastrzyku podskórnym:

Produkty	DL 50 (g/kg s. c.)
Spiramycyna I	1,01
Spiramycyna II	1,52
Spiramycyna III	2,04

Aktywność antybakteryjna in vitro i in vivo spiramycyn II i III jest co najmniej równa aktywności spiramycyny I.

Wykazano już, że za pomocą specjalnych warunków fermentacji, zwłaszcza przez zmiany składu podłoża hodowli, można wpływać na stosunek trzech spiramycyn obecnych w produk-

cie wytworzonym przez streptomyces ambofaciens NRRL 2420. Jednakże przy podłożach zazwyczaj stosowanych do wytworzenia spiramycyny, czy to będą podłoża oparte na podstawie mało zdefiniowanych substancji złożonych, czy też środowiska czysto syntetyczne, zawartość spiramycyny I w otrzymanej spiramycynie pozostaje dość znaczna. Wynika z tego, że otrzymanie spiramycyn II i III wolnych od spiramycyny I, jest dość trudne i udaje się z wydajnością niezadawalającą.

Stwierdzono, że pracując w warunkach odpowiednich, można pokierować fermentacją *S. ambofaciens* lub jego mutantów w taki sposób, że osiąga się znaczne zwiększenie ilości spiramycyny II i (albo) spiramycyny III w całej spiramycynie wyprodukowanej przez mikroorganizm. Ilość np. spiramycyny III może osiągnąć 75—80% ogólnej wagi spiramycyny. Stwierdzono również, że ten sam *S. ambofaciens* lub jego mutanty są zdolne do przekształcenia spiramycyny I w spiramycynę II i spiramycynę III, jeżeli fermentację (fermentacja w zwykłym środowisku, złożonym lub syntetycznym albo fermentacja w podłożu zawierającym spiramycynę I) przeprowadza się w obecności czynnika acetylującego lub propionylującego, w zależności od tego, czy chce się utrzymać spiramycynę II, czy też spiramycynę III.

Jako czynnik acetylujący można stosować kwas octowy, jego sole, estry lub acetamid. Można również stosować każdy związek, zdolny do wytworzenia, po przekształceniu przez *S. ambofaciens*, rodnika acetylowego, jak np. kwas masłowy i jego pochodne. Ze względu na wygodę stosuje się najchętniej kwas octowy lub octan sodowy, w stężeniu 0,1—30 g/l środowiska przemiany.

Jako czynnik propionylujący można stosować kwas propionowy, jego sole i estry, propionamid lub propanol. Można również użyć każdy związek zdolny do wytwarzania, po przemianieniu przez *S. ambofaciens*, rodnika propionylowego, jak kwas walerianowy lub jego sole. Ze względu na prostotę stosuje się np. szczególnie kwas propionowy lub jego sole albo propionamid w stężeniu 0,1—30 g/l litra podłoża, przy czym optymalne stężenie wynosi w przybliżeniu 2—15 g/l litra. Zależnie od potrzeby można dodawać czynnika acetylującego w rozpuszczalniku organicznym, np. metanolu, etanolu, acetonie, benzenie, eterze lub dwuchloroetanem. Można również dodawać potrzebną ilość czynnika acylującego rozdzieloną

na kilka kolejnych porcji bez wywołania specjalnych zmian w pożądanej przemianie.

W przypadku zwykłych podłoży złożonych lub syntetycznych fermentacja nie następuje trudno i przebiega normalnie.

W przypadku środowiska zawierającego spiramycynę I trzeba było ściśle ustalić różne czynniki, które sprzyjają biochemicznej przemianie spiramycyny I na spiramycynę II lub III i praktycznie doprowadzić tę przemianę do skutku. W szczególności należy doprowadzić hodowlę *S. ambofaciens* w warunkach, które pozwalają zarazem na jego rozwój, jak też i wytworzenie określonego układu enzymatycznego. Należy również wykorzystać zdolność hodowli do przemiany przez umieszczenie jej w warunkach wymaganych dla tej przemiany.

Można więc hodować *S. ambofaciens* na podłożu zawierającym od początku spiramycynę I, przeznaczoną do przemiany, jak też wszystkie czynniki potrzebne do wytworzenia układu enzymatycznego i do przemiany za pomocą tego układu obecnej spiramycyny I na spiramycynę II i III. Jednakże stwierdzono, że szczególnie korzystnym dla zrealizowania wynalazku jest hodowanie *S. ambofaciens* w pierwszej fazie w warunkach takich, aby wytworzył on enzymatyczny układ acylujący. W drugiej fazie wykorzystuje się zdolność przekształcania nabytą przez grzybek, umieszczając jego grzybnię razem ze spiramycyną I i czynnikami, niezbędnymi do przemiany, a mianowicie z substancjami zdolnymi do dostarczania rodnika acetylowego lub propionylowego i z aktywatorami.

Mając na względzie wytwarzanie układu enzymatycznego acylującego można hodowlę *S. ambofaciens* prowadzić na różnych podłożach, szczególnie na podłożach zazwyczaj wykorzystywanych do otrzymywania spiramycyny, a mianowicie na podłożach złożonych lub syntetycznych. Natomiast ilość i jakość układu enzymatycznego acylującego może się w znacznej mierze zmieniać, zależnie od składu zastosowanego podłoża. Również w celu otrzymania grzybni o wysokiej zdolności przekształcania spiramycyny I w spiramycynę II lub III jest korzystne bardzo staranne dobieranie składników wchodzących w skład podłoża.

Stwierdzono, że szczególnie korzystne jest stosowanie podłoża syntetycznego, zawierającego źródło energetyczne glucydowe, źródło azotu amoniakalnego i substancje zobojętniające. Najlepiej stosować glukozę lub skrobię w zmien-

nych dawkach 1—100 g/litr, przy czym optymalna ilość wynosi 40—60 g/litr. Spośród soli amoniakalnych stosuje się chlorek, siarczan, lub azotan amonowy, przy czym ilość azotu amoniakalnego może się zmieniać od 0,1—10 g/litr, a optimum mieści się między 2—4 g/litr.

W celu otrzymania dużej zdolności przekształcania spiramycyny I, należy wyjściową wartość pH hodowli *S. ambofaciens* nastawić na 5—9, najlepiej 6,5—7,5.

W celu uniknięcia zmiany wartości pH podłoża w kierunku zbyt niskich wartości, co mogłoby źle wpływać na korzystne wytwarzanie układu enzymatycznego acylującego, należy dodać do pożywki w stosownym momencie odpowiednią ilość substancji zobojętniających, w celu podtrzymania pożądanej wartości pH. Można użyć do tego celu czynników alkalicznych, np. wodorotlenków i węglanów metali alkalicznych i ziem alkalicznych w roztworze lub zawieszinie wodnej, można również dodać od początku hodowli rezerwowej substancji zobojętniającej, np. nierozpuszczalnych węglanów metali ziem alkalicznych. Najlepiej stosować węglan wapniowy w ilościach 1—50 g/litr, przy czym dawka optymalna wynosi około 25 g/litr.

S. ambofaciens należy również hodować w ściśle określonych warunkach temperatury, ażeby nastąpiło maksymalne wytwarzanie enzymatycznego układu acylującego. Można np. prowadzić hodowlę w temperaturze 20—35°C, a najkorzystniej w temperaturze 23—27°C.

Hodowlę *S. ambofaciens* można prowadzić w warunkach zazwyczaj stosowanych przy prowadzeniu fermentacji aerobowej, a specjalnie w aparacie pozwalającym zarazem na dobre rozprowadzenie powietrza, koniecznego streptomycetom do oddychania, oraz zachowanie jednorodności hodowli.

Ustalono, że zdolność hodowli *S. ambofaciens* do przekształcania zmienia się z wiekiem kultury. Na początku zdolność przekształcania praktycznie jest proporcjonalna do ilości grzybni obecnej w hodowli. Po pewnym czasie ustala się maksymalną zdolność przekształcania, a następnie w miarę rozrastania się grzybni zdolność ta maleje. Praktyka wykazuje, że grzybnia posiada maksymalną zdolność przekształcania po 30—150 godzinach hodowli, najczęściej po 40—100 godzinach, przy czym ten optymalny czas należy zasadniczo od ogólnych warunków hodowli.

Po przygotowaniu hodowli *S. ambofaciens* lub jego mutantów sposobem opisanym, mającym

na celu wytworzenie układu enzymatycznego acylującego, który przekształca spiramycynę I w spiramycynę II i III, należy następnie umieścić ten sam streptomyces w warunkach specjalnie wybranych w celu wykorzystania jego zdolności przetwarzania i osiągnięcia pożądanego przekształcenia. Można dodać do hodowli takiej jaką otrzymano wraz ze spiramycyną I, przeznaczoną do tej przemiany, czynników potrzebnych do tej przemiany, a mianowicie: acylujących i aktywatorów. Można również za pomocą odpowiednich środków oddzielić grzybnie *S. ambofaciens*, a następnie umieścić ją na podłożu dostosowanym do przemiany i zawierającym spiramycynę I, czynniki acylujące i aktywatory.

Stwierdzono, że ilość produktów przemiany spiramycyny I zmienia się w znacznym stopniu w zależności od natury rodników acylowych, obecnych w podłożu przemiany. Rodniki acylowe o 3 atomach węgla przyłączają się łatwiej do spiramycyny I niż rodniki o 2 atomach.

Każdorazowo, gdy dwa typy rodników są obecne jednocześnie, w podłożu przemiana spiramycyny I w spiramycynę III przebiega z wykorzystaniem w pierwszym rzędzie rodników o 3 atomach węgla. Ustalono, że można więc pokierować przemianą spiramycyny I na spiramycynę III doprowadzając do środowiska przemiany substancji zdolnych do dostarczenia znacznych ilości rodnika propionylowego. Ustalono również, że przemianę spiramycyny I, zwłaszcza w spiramycynę II można przeprowadzić tylko w przypadku nieobecności w środowisku przemiany wszystkich substancji zdolnych do dostarczenia rodnika propionylowego. Ponieważ *S. ambofaciens* wytwarza z bardzo wielką łatwością i w najróżniejszych środowiskach substancje zdolne do dostarczania rodnika propionylowego, przemiana spiramycyny I w spiramycynę II może nastąpić tylko w warunkach bardzo specjalnych.

Jeżeli jako podłoże stosuje się wprost hodowle otrzymane z myślą wytworzenia układu acylującego, wówczas przez dodanie czynnika propionylującego otrzymuje się praktycznie czystą spiramycynę III. W przypadku dodawania czynnika acetylującego i obecności tylko małych ilości czynnika propionylującego spiramycyna I przemienia się jedynie w mieszaninę spiramycyn II i III.

Jeżeli grzybnie *S. ambofaciens* oddzieli się od podłoża, które służyło do wytworzenia enzymatycznego układu acetylującego, wówczas przemianą spiramycyny I można pokierować

bardziej dokładnie. Wystarczy wówczas doprowadzić do grzybni oprócz ewentualnych aktywatorów, substancji mogących dostarczyć rodników acylowych, a w zależności od natury tych ostatnich, otrzymuje się spiramycynę II, spiramycynę III lub ich mieszaninę. Ten sposób jest szczególnie korzystny przy wytwarzaniu spiramycyny I, którą otrzymuje się jedynie w razie obecności substancji zdolnych do dostarczenia rodnika acylowego, a w nieobecności substancji zdolnych do dostarczenia rodnika propionylowego, a w szczególności tych, które mogą pochodzić z metabolizmu *S. ambofaciens*.

Spiramycynę I można stosować w stanie czystym lub w mieszaninie ze spiramycynami II i III, którą to mieszaninę można otrzymać zwykłymi sposobami produkcyjnymi ze spiramycyny surowej. Spiramycynę można stosować w postaci zasady lub soli i można dodawać ją do podłoża w stanie stałym lub rozpuszczoną. W celu łatwiejszego stosowania można np. spiramycynę w postaci zasady rozpuszczać w wodzie, metanolu, etanolu, eterze, acetonie, benzynie lub dwuchloroetanie. Można ją również stosować w postaci soli, szczególnie chlorowodoru siarczanu, octanu i propionianu w roztworze wodnym.

Korzystnym jest gdy stężenie roztworów spiramycyny dodawanych do podłoża jest takie, że nie zachodzi zbyt duże rozcieńczenie tego podłoża. Końcowe stężenie spiramycyny I w podłożu może się zmieniać od 1—50 g/litr, lecz szczególnie korzystne jest stosowanie spiramycyny I w stężeniu około 5—20 g/litr. To stężenie można osiągnąć przez jednorazowe dodanie spiramycyny I lub przez kilkakrotne częściowe dodawanie, bez wywołania znacznych zmian w otrzymywanym produkcie.

A więc jak wynika z powyższych rozważań hodowla *S. ambofaciens*, posiadająca układ enzymatyczny acylujący, ewentualnie z dodatkiem czynnika acylującego jest zdolna sama do przeprowadzenia przemiany enzymatycznej spiramycyny I i to jest przedmiotem zgłoszonego wynalazku.

Dodawanie wielu soli mineralnych lub organicznych nie przynosi znacznych zmian w ilości przemienionej spiramycyny I. Stwierdzono jednak, że pewne aniony i kationy wywierają korzystny wpływ na przemianę spiramycyny I w spiramycynę II i III bądź przyspieszając przemianę, bądź powiększając ilość przekształconej spiramycyny.

Wśród anionów odgrywających rolę aktywatorów reakcji enzymatycznej znajduje się chlor. Można dodawać go w postaci chlorków metali alkalicznych, ziem alkalicznych lub innych, pod warunkiem, że metal nie jest inhibitorem przemiany. Ilość chloru wprowadzonego do podłoża w postaci chlorku może wynosić 0,1—20 g/litr, przy czym optymalna dawka wynosi około 1—3 g/litr.

Wśród kationów zdolnych do polepszenia reakcji przemiany, szczególnie aktywnymi są magnez, żelazo i kobalt. Ten ostatni metal zachowuje się jak aktywator wybiórczy enzymatycznej reakcji acylowania. Metale te można dodawać pod postacią chlorków, siarczanów, azotanów lub innych soli nie przeszkadzających reakcji enzymatycznej. Można stosować np. magnez i żelazo w ilości 0,1—500 mg/litr podłoża, przy czym optimum wynosi około 5—10 mg/litr. Można też stosować kobalt w ilościach 0,1—1000 mg/litr, przy czym optimum wynosi 10—400 mg/litr.

W celu uzyskania przemiany spiramycyny I w spiramycynę II i III, w możliwie najlepszych warunkach należy dodawać do hodowli *S. ambofaciens*, posiadającej enzymatyczny układ acylujący podlegającą przemianie spiramycynę I, czynniki acylujące i aktywatory.

Dodawanie tych różnych składników może następować jednocześnie lub w różnym czasie. W tym ostatnim przypadku jeśli chce się prawidłowo pokierować przemianą, należy dodawać spiramycynę I po uprzednim dodaniu czynników acylujących i aktywatorów.

Wreszcie stwierdzono, że w pewnych przypadkach korzystne jest wprowadzenie do hodowli źródła energetycznego, jak glukozy lub skrobi równocześnie ze spiramycyną I, czynnikami acylującymi i aktywatorami. Jest to ważne, zwłaszcza w przypadku, gdy grzybnię *S. ambofaciens* oddziela się od podłoża lub gdy umieszcza się ją na podłożu zawierającym tylko spiramycynę, czynniki acylujące i aktywatory. Glukozę i skrobię można dodawać w ilości 1—50 g/litr, przy czym optimum wynosi około 10 g/litr.

W przypadku, gdy jako podłoże stosuje się hodowlę wytwarzającą układ enzymatyczny acylujący, wówczas dodawanie różnych składników do podłoża przeprowadza się przy ściśle oznaczonej wartości pH podłoża na ogół w granicach pH 5,0—8,0 ściślej 6,0—7,0. W celu przeprowadzenia przemiany w możliwie najlepszych warunkach może okazać się korzystnym zmienienie, w pewnych przypadkach wartości pH hodowli,

w chwili dodawania do niej różnych składników. Stosuje się wówczas do tego celu różne substancje kwaśne lub alkaliczne, których wybór zależy w pierwszym rzędzie od ich ewentualnych właściwości hamowania reakcji przemiany np. kwas solny, siarkowy, azotowy, octowy, propionowy, cytrynowy, wodorotlenki: sodowy, potasowy, amonowy, wapniowy, barowy.

W przypadku, kiedy przemianę przeprowadza się przez oddzielenie grzybni *S. ambofaciens* od środowiska wytwarzającego układ enzymatyczny i przez umieszczenie grzybni razem ze spiramycyną, czynnikami acylującymi, aktywatorami i substancjami energetycznymi również korzystne jest prowadzenie przemiany tej w warunkach ściśle określonej wartości pH. Można więc regulować wartość pH od 3,0 do 8,0 za pomocą środków buforujących, jak mieszaniny kwasu octowego i octanu, kwasu propionowego i propionianu, kwasu cytrynowego i cytrynianu, kwasu ftalowego i ftalanu.

Wreszcie niezależnie od sposobu przemiany jak się wybierze, korzystne jest poprawienie ewentualnej zmiany wartości pH, występującej w trakcie przemiany, przez dodawanie odpowiednich czynników zakwaszających lub alkalinizujących lub mieszanin buforujących.

Przemiana spiramycyny I w spiramycynę II i III przez *S. ambofaciens* wymaga utrzymywania hodowli tego organizmu w warunkach całkowicie aerobowych i wykorzystywania hodowli tej do wytworzenia układu enzymatycznego lub grzybni oddzielonej od tej hodowli. Po dodaniu różnych składników należy utrzymywać podłoże w warunkach napowietrzania i mieszania, zbliżonych do tych jakie były stosowane dla tej hodowli.

Temperatura, w której przeprowadza się przemianę enzymatyczną acylującą nie ma większego znaczenia w zwykłych warunkach pracy. Można pracować w granicach temperatur 15—40°C, przy czym optymalna temperatura wynosi około 25°C.

Przemiana spiramycyny I w spiramycynę II i III jest przemianą stosunkowo szybką tak, że w ciągu 24 godzin znaczna część spiramycyny I ulega tej przemianie.

W celu uzyskania maksymalnej wydajności przemiany, należy zachować w poszczególnych przypadkach dostateczny okres zetknięcia między układem enzymatycznym acylującym, spiramycyną i innymi składnikami tak, że do całkowitej przemiany może być potrzebny szereg dni.

Po przekształceniu opisanymi sposobami spiramycyny I w spiramycynę II i III, te ostatnie można oddzielić znanymi sposobami, np. przez rozdzielanie w przeciwprądzie, chromatografię na tlenku glinowym lub innych absorbentach, frakcjonowaną krystalizacją. Jeżeli pragnie się jedynie poznać wzajemne stosunki różnych spiramycyn w trakcie lub na końcu przemiany, wówczas wygodnie jest przeprowadzić oznaczenie przez chromatografię bibułową podłoża i porównać otrzymane chromatogramy z chromatogramami wzorcowymi o znanych ilościach poszczególnych spiramycyn w stanie czystym.

Przytoczone przykłady, nieograniczające wynalazku wyjaśniają jak można praktycznie stosować sposób według wynalazku.

P r z y k ł a d I. W erlenmayerce na 2 litry umieszcza się 250 cm³ pożywki o następującym składzie:

namoku kukurydzianego (50% suchej substancji)	40 g
glukozy	20 g
chlorku sodowego	5 g
siarczanu magnezowego	1 g
wody wodociągowej	1000 cm ³

Wartość pH nastawia się na 6,8 za pomocą ługu sodowego i dodaje się:

węglań potasowego	5 g
oleju sojowego	4 cm ³ .

Tę pożywkę sterylizuje się przez 45 minut w temperaturze 120°C. Po oziębieniu zaszczepia się ją czystą hodowlą z żelatyny szczepu *Streptomyces ambofaciens* NRRL 2420 i wstrząsa na wstrząsarce w ciągu 48 godzin.

Oddzielnie w erlenmayerkach na 300 cm³ umieszcza się po 50 cm³ następującej pożywki:

Namoku kukurydzianego (50% suchej substancji)	35 g
glukozy	50 g
chlorku sodowego	20 g
fosforanu jednopotasowego	2 g
siarczanu magnezowego	1 g
wody wodociągowej	1000 cm ³

Wartość pH nastawia się na 6,8 za pomocą ługu sodowego, po czym dodaje się:

węglań sodowego	5 g
-----------------	-----

Następnie dodaje się propionamid w ilościach wskazanych poniżej w tablicy, w której podano też zestawienie osiągniętych wyników.

Erlenmayerki sterylizuje się przez 20 minut w temperaturze 120°C, po oziębieniu zaszczepia 4 cm³ hodowli z erlenmayerki na 2 litry i wstrząsa na wstrząsarce w temperaturze 25°C. Dawkowanie i analizę antybiotyku przeprowadza się po 6, 7 i 8 dniach hodowli, ażeby ustalić maksymalną aktywność w ilości poszczególnych 3 spiramycyn.

Zawartość propionamidu w pożywce g/litr	Maksymalna aktywność mcg/cm ³	Ilość spiramycyn w % wagowych		
		I	II	III
0	285	51	26	23
1	205	27	18	55
2	175	24	10	66
4	150	15	7	78

P r z y k ł a d II. W zbiorniku fermentacyjnym na 170 litrów umieszcza się:

Namoku kukurydzianego (50% suchej substancji) 4.800 kg
 glukozy 2.400 kg
 chlorku sodowego 0.600 kg
 siarczanu magnezowego 0.120 kg
 wody wodociągowej 100 litrów.

Wartość pH doprowadza się za pomocą ługu sodowego do 6,8 i zawartość aparatu uzupełnia się:

węglanem wapniowym 0.600 kg
 olejem sojowym 0.480 l.

Pożywkę sterylizuje się przez 45 minut w temperaturze 120°C. Następnie w temperaturze 25°C pożywkę zaszczepia się 250 cm³ hodowli *S. ambofaciens* przygotowanej w erlenmayerce wstrząsanej na wstrząsarce.

Hodowlę w zbiorniku fermentacyjnym napowietrza się i miesza w ciągu 25 godzin. Służy ona do zaszczepiania hodowli produkcyjnej, wytwarzanej w zbiorniku fermentacyjnym na 30 litrów, w którym umieszcza się następującą pożywkę:

autolizatu drożdżowego 300 g
 glukozy 750 g
 propionamidu 30 g
 chlorku sodowego 300 g
 siarczanu magnezowego 15 g
 fosforanu jednopotasowego 15 g
 wody wodociągowej 16,5 litra.

Za pomocą ługu sodowego doprowadza się wartość pH do 6,5. Zawartość zbiornika uzupełnia się:

węglanem wapniowym 75 g
 olejem sojowym 60 cm³.

Pożywkę sterylizuje się przez 40 minut w temperaturze 120°C. Po oziębieniu objętość wynosi 15 litrów, a wartość pH = 6,8.

Pożywkę zaszczepia się przez przeniesienie 2 litrów hodowli zaszczepiającej z naczynia do fermentacji na 170 litrów, następnie miesza się za pomocą mieszadła turbinowego o 550 obrotach/minutę, napowietrza 1 m³ powietrza/godzinę i utrzymuje w temperaturze 25°C.

Od początku procesu pH obniża się regularnie osiągając po około 60 godzinach wartość 5,6. Ta pierwsza faza odpowiada ściśle zużyciu glukozy. Następnie w okresie do 90 godzin wartość pH powoli wzrasta (6,2) a po 100 godzinach bardzo gwałtownie, dochodzi do 7.

Aktywność końcowa brzcзки wynosi 645 mcg/cm³. Stosunek wagowy trzech wyprodukowanych spiramycyn przedstawia się następująco:

I — 12%, II — 13%, III — 75%.

Proces przeprowadzony równolegle na takiej samej pożywce, lecz bez propionamidu dał po 120 godzinach aktywność 760 mcg/cm³, z następującym podziałem:

I — 24%, II — 53%, III — 23%.

P r z y k ł a d III. Hodowlę zaszczepiającą otrzymuje się jak w przykładzie II. Hodowlę produkcyjną wytwarza się tym razem w zbiorniku fermentacyjnym na 800 litrów, w którym umieszcza się pożywkę o następującym składzie:

skrobi 16 kg
 chlorku amonowego 1.600
 propionamidu 1.600
 chlorku potasowego 1.200
 chlorku sodowego 6.800
 fosforanu jednopotasowego 2.000
 siarczanu magnezowego 0.400
 kwasu cytrynowego 0.400
 siarczanu cynkowego siedmiowodnego 40 g
 chlorku kobaltowego sześciowodnego 0.12 g
 wody wodociągowej 370 litrów.

Przez dodanie 1450 cm³ ługu sodowego o 36° Be doprowadza się wartość pH do 6,7.

Pożywkę uzupełnia się:
 węglanem potasowym 2 kg
 olejem sojowym 1600 cm³.

Pożywkę sterylizuje się przez mieszanie parą za pomocą bełkotki, w temperaturze 120°C w ciągu 40 minut. Po oziębieniu objętość wynosi 400 litrów, a wartość pH = 6,7. Środowisko zaszczenia się przenosząc 40 litrów hodowli zaszczenia ze zbiornika fermentacyjnego na 170 litrów, następnie miesza się za pomocą mieszadła turbinowego o 205 obrotach/minutę, napowietrza 15 m³ powietrza/godzinę i utrzymuje się w temperaturze 25°C. Po 150 godzinach hodowli aktywność brzezki jest maksymalna: 660 mcg/cm³. Stosunek wagowy trzech wyprodukowanych spiramycyn przedstawia się następująco:

I — 17%, II — 8%, III — 75%.

P r z y k ł a d IV. W erlenmayerce na 2 litry umieszcza się 250 cm³ następującej pożywki: Namoku kukurydzianego (50% suchej substancji) 40 g
skrobi 20 g
chlorku sodowego 5 g
siarczanu magnezowego 1 g
fosforanu jednopotasowego 2 g
wody wodociągowej do 1000 cm³

Wartość pH nastawia się na 6,8 za pomocą ługu sodowego i dodaje się: węglanu wapniowego 5 g

Pożywkę sterylizuje się w temperaturze 120°C w ciągu 45 minut. Następnie po oziębieniu zaszczenia się czystą hodowlą z żelatyny, szczepu S. ambofaciens.

Hodowlę wytrząsa się na wytrząsarce w ciągu 48 godzin w temperaturze 25°C.

Oddzielnie w erlenmayerkach na 300 cm³ umieszcza się po 40 cm³ następującej pożywki: Namoku kukurydzianego (50% suchej substancji) 45 g
glukozy 50 g
węglanu wapniowego 25 g
wody wodociągowej do 1000 cm³.

Wartość pH środowiska doprowadza się za pomocą ługu sodowego do 7,0. Następnie sterylizuje się pożywkę przez 30 minut w temperaturze 120°C. Po oziębieniu zaszczenia się zawartość każdej erlenmayerki 4 cm³ poprzedniej hodowli zaszczenia. Hodowlę wytrząsa się na wstrząsarce w temperaturze 25°C. Po 48 godzinach osiąga się znakomity rozwój grzybków. Dodaje się wówczas do każdej erlenmayerki 20 cm³ wysterylizowanego wodnego roztworu, zawierającego 12 g/litr czystej spiramycyny I w postaci zasady i 6 g/litr propionianu sodowego. Miesza-

nie hodowli utrzymuje się przez 24 godziny, po czym miesza się razem zawartość wszystkich erlenmayerek. Analiza chromatograficzna bulionu wykazuje, że zawiera on 2,6 g/litr spiramycyny I nieprzekształconej i 1,4 g/litr mieszaniny zawierającej 20% spiramycyny II i 80% spiramycyny III.

P r z y k ł a d V. W erlenmayerkach na 300 cm³ umieszcza się po 40 cm³ następującej pożywki:

ekstraktu drożdżowego 30 g
glukozy 50 g
węglanu wapniowego 25 g
wody wodociągowej do 1000 cm³.

Wartość pH nastawia się na 7,0 za pomocą węglanu wapniowego. Następnie pożywkę sterylizuje się przez 30 minut w temperaturze 120°C. Po oziębieniu zawartość każdej erlenmayerki zaszczenia się 4 cm³ hodowli zaszczenia przygotowanej w warunkach opisanych w przykładzie IV.

Hodowlę miesza się na wstrząsarce w temperaturze 25°C. Po 48 godzinach rozwoju dodaje się do każdej erlenmayerki po 20 cm³ wodnego wysterylizowanego roztworu, zawierającego 12 g/litr czystej spiramycyny I w postaci zasady i 6 g/litr propionianu sodowego i pozostawia do inkubacji na wstrząsarce przez 3 dni. Po tym czasie miesza się razem zawartość erlenmayerki. Analiza chromatograficzna bulionu hodowli wykazuje, że znajduje się w nim jeszcze 2,1 g/litr spiramycyny I nie przekształconej w mieszaninę zawierającą 6% spiramycyny II i 94% spiramycyny III.

P r z y k ł a d VI. W erlenmayerkach na 300 cm³ umieszcza się po 40 cm³ następującej pożywki:

chlorku amonowego 6 g
glukozy 25 g
węglanu wapniowego 20 g
wody wodociągowej do 1000 cm³.

Zawartość erlenmayerek sterylizuje się, zaszczenia i hoduje w warunkach opisanych w przykładzie V. Po 48 godzinach hodowli dodaje się do każdej erlenmayerki 20 cm³ sterylizowanego roztworu wodnego, zawierającego 9 g/litr czystej spiramycyny I w postaci zasady i 21 g/litr propionamidu.

Po 3 dniach inkubacji analiza chromatograficzna bulionu wykazuje, że 1,86 g/litr spiramycyny I zostało przekształcone w mieszaninę za-

wierającą 55% spiramycyny II i 45% spiramycyny III. Pozostaje więc 1,14 g/litr spiramycyny I nie przekształconej.

P r z y k ł a d VII. Hodowlę *S. ambocaeni* otrzymuje się w warunkach opisanych w przykładzie VI. Roztwór zawierający spiramycynę w postaci zasady zawiera oprócz tego 6 g/litr propionianu sodowego. Chromatografia bibułowa bulionu hodowli wykazuje 0,96 g/litr spiramycyny I nie przekształconej i 2,04 g/litr spiramycyny I przekształconej w mieszaninę zawierającą 11% spiramycyny II i 89% spiramycyny III.

P r z y k ł a d VIII. W erlenmayerkach na 300 cm³ umieszcza się po 40 cm³ następującej pożywki:

chlorku amonowego 10 g
 glukozy 50 g
 węglanu wapniowego 25 g
 wody wodociągowej do 1000 cm³.

Zawartość erlenmayerki sterylizuje się, zaszczepia i hoduje w warunkach opisanych w przykładzie V. Po 48 godzinach hodowli dodaje się do każdej erlenmayerki po 20 cm³ wysterylizowanego wodnego roztworu, zawierającego 12 g/litr spiramycyny I w postaci zasady i 6 g/litr propionianu sodowego. Erlenmayerki dzieli się na cztery partie.

Pierwszą partię pozostawia się bez zmian. Do trzech pozostałych dodaje się odpowiednio siarczanu magnezowego, siarczanu żelazowego, chlorku kobaltowego. Dodaje się te sole w ten sposób, żeby każdy metal znajdował się w stężeniu 1 miliomola na 1 liter pożywki. Po 3 dniach inkubacji, erlenmayerki z każdej partii umieszcza się razem i ich zawartość analizuje za pomocą chromatografii bibułowej. Wyniki analizy są następujące:

Aktywator	Ilość spiramycyny I przekształconej g/litr	Stosunek spiramycyn w %	
		II	III
0	1,88	21	79
magnez	2,12	28	72
żelazo	2,32	30	70
kobalt	2,85	27	73

P r z y k ł a d IX. Erlenmayerki na 300 cm³ napełnia się, po czym przeprowadza się sterylizację, zaszczepienie i hodowlę w warunkach opisanych w przykładzie VIII. Po 48 godzinach

hodowli erlenmayerki rozdziela się na 2 partie. Do każdej z erlenmayerek z pierwszej partii dodaje się po 20 cm³ wodnego, wysterylizowanego roztworu, zawierającego 12 g/litr czystej spiramycyny I w postaci zasady i 6 g/litr propionianu sodowego. Do każdej erlenmayerki z drugiej partii dodaje się po 20 cm³ wyżej wymienionego roztworu z dodatkiem 30 g/litr chlorku sodowego. Każdą partię erlenmayerek traktuje się jak poprzednio. Wynik analizy chromatograficznej jest następujący:

NaCl g/litr	Ilość spiramycyny I przekształconej g/litr	Stosunek spiramycyn w %	
		I	II
0	1,88	21	79
10	2,60	23	77

P r z y k ł a d X. W erlenmayerkach na 300 cm³ umieszcza się po 50 cm³ następującej pożywki:

chlorku amonowego 10 g
 glukozy 50 g
 węglanu wapniowego 25 g
 wody wodociągowej do 1000 cm³.

Zawartość erlenmayerki sterylizuje się, zaszczepia i hoduje w warunkach opisanych w przykładzie V.

Po 52 godzinach hodowli, do każdej erlenmayerki dodaje się 1 cm³ 15%-owego propionianu sodowego, po czym erlenmayerki rozdziela się na dwie partie. Do każdej erlenmayerki z pierwszej partii dodaje się 2 cm³ 15%-owego roztworu metanolowego czystej spiramycyny I w postaci zasady. Do każdej erlenmayerki z drugiej partii dodaje się roztworu o takim samym składzie, ale w acetonie. Hodowlę pozostawia się do inkubacji przez 72 godziny na wstrząsarce. Zawartość erlenmayerek z tej samej partii, zbiera się razem i analizuje za pomocą chromatografii. Wyniki przemiany są następujące:

Rozpuszczalnik	Ilość spiramycyny I przekształconej g/litr	Stosunek spiramycyn w %	
		II	III
metanol	3,48	24	76
aceton	3,36	27	73

P r z y k ł a d XI. Erlenmayerki na 300 cm³ napełnia się jak w przykładzie poprzednim, sterylizuje przez 30 minut w temperaturze 120°C

i zaszczepia każdą 6 cm³ hodowli zaszczepiającej, przygotowanej jak w przykładzie IV. Erlenmayerki umieszcza się w celu inkubacji na wstrząsarce w temperaturze 25°C, po czym dzieli się je na 3 partie. Po 48 godzinach hodowli do każdej erlenmayerki z pierwszej partii, dodaje się 2 cm³ 15%-owego roztworu metanoloowego czystej spiramycyny I w postaci zasady i 1 cm³ 15%-owego wodnego roztworu propionianu sodowego. To samo dodaje się do każdej erlenmayerki z dwóch pozostałych partii z tym, że do drugiej po 72, a do trzeciej po 96 godzinach hodowli. W każdym przypadku hodowlę prowadzi się przez trzy dni licząc od dnia dodania spiramycyny. Zawartość erlenmayerek każdej partii analizuje się za pomocą chromatografii bibułowej. Wyniki analizy przedstawia tablica:

Dodane spiramycynę godzinę	Ilość spiramycyny I przekształconej g/litr	Stosunek spiramycyn w %	
		II	III
48	3.00	16	84
72	3.06	18	82
96	1.62	28	72

P r z y k ł a d XII. W erlenmayerkach na 300 cm³ umieszcza się po 50 cm³ następującej pożywki:

azotanu amonowego 13 g
 glukozy 50 g
 węglanu wapniowego 25 g
 wody wodociągowej do 1000 cm³.

Erlenmayerki sterylizuje się przez 30 minut w temperaturze 120°C, oziębia i zaszczepia każdą 5 cm³ hodowli zaszczepiającej, której wytwarzanie opisano w przykładzie IV. Po trzech dniach hodowli na wstrząsarce w temperaturze 25°C dodaje się do każdej erlenmayerki 5 cm³ wodnego roztworu zawierającego 100 g/litr czystej spiramycyny I, w postaci zasady, 38 g/litr kwasu propionowego i 10 g/litr chlorku kobaltowego dziesięciowodnego, którego wartość pH doprowadza się do 6,5 przez dodanie ługu sodowego. Hodowlę dodatkowo pozostawia się na trzy dni, po czym zawartość erlenmayerek analizuje się za pomocą chromatografii bibułowej. 8,7 g/litr spiramycyny I zostało przekształconych w mieszaninę zawierającą 9% spiramycyny II i 91% spiramycyny III.

P r z y k ł a d XIII. W erlenmayerkach na 300 cm³ umieszcza się po 50 cm³ następującej pożywki:

azotanu amonowego 20 g
 skrobi 60 g
 węglanu wapniowego 25 g
 wody wodociągowej do 1000 cm³.

Erlenmayerki sterylizuje się, zaszczepia i pozostawia do inkubacji w warunkach opisanych w przykładzie V. Po 96 godzinach hodowli dodaje się do każdej erlenmayerki po 5 cm³ wodnego roztworu zawierającego 140 g/litr surowej spiramycyny w postaci zasady (składającej się z 59%, 27% i 14% spiramycyny I, II i III) 56 g/litr kwasu propionowego, 0,5 g/litr chlorku kobaltowego sześciowodnego i doprowadza za pomocą ługu sodowego do pH = 6,5. Hodowlę prowadzi się przez 3 dni, po czym przeprowadza się analizę chromatograficzną zawartości erlenmayerki. Z każdych 8,26 g/litr wprowadzonej do hodowli spiramycyny I 6,30 g/litr przekształca się w mieszaninę zawierającą 13% spiramycyny II i 87% spiramycyny III.

P r z y k ł a d XIV. W dwóch erlenmayerkach na 300 cm³ umieszcza się po 50 cm³ następującej pożywki:

chlorku amonowego 10 g
 glukozy 50 g
 węglanu wapniowego 25 g
 wody wodociągowej do 1000 cm³.

Erlenmayerki sterylizuje się, zaszczepia i pozostawia do inkubacji w warunkach opisanych w przykładzie V. Po 72 godzinach hodowli zawartość erlenmayerek odwirowuje się i oddziela ciecz znajdującą się na wierzchu. Z połowy zawartości wirówki wytwarza się z powrotem zawiesinę w 50 cm³ wodnego roztworu umieszczonego w erlenmayerce 300 cm³ i zawierającego 6 g/litr czystej spiramycyny I w postaci zasady 2,3 g/litr kwasu propionowego i 1 g/litr chlorku kobaltowego sześciowodnego. Roztwór doprowadza się przez dodanie ługu sodowego do wartości pH = 6,5. Z drugiej połowy zawartości wirówki wytwarza się zawiesinę w 50 cm³ roztworu wodnego o tym samym składzie co wyżej wymieniony, lecz zawierającego ponadto 10 g/litr glukozy.

Obie erlenmayerki zawierające zawiesinę grzybni poddaje się inkubacji w temperaturze 25°C na wstrząsarce w ciągu 2 dni. Po tym czasie zawartość każdej erlenmayerki analizuje

się za pomocą chromatografii. Wyniki przemiany są następujące:

	Ilość przekształconej spiramycyny I g/litr	Stosunek spiramycyn w %	
		II	III
bez glukozy	2.22	14	86
z glukozą	3.70	14	86

P r z y k ł a d XV. W erlenmayerce na 300 cm³ umieszcza się po 50 cm³ następującej pożywki:

chlorku amonowego	10 g
glukozy	50 g
węgla wapniowego	25 g
wody wodociągowej	do 1000 cm ³ .

Zawartość erlenmayerki sterylizuje się, zaszczepia i poddaje inkubacji w warunkach opisanych w przykładzie V. Po 72 godzinach hodowli, zawartość erlenmayerki odwirowuje się i ciecz z wierzchu oddziela się. Zawartość wirówki z powrotem przeprowadza się w zawieszinę w 50 cm³ roztworu buforowego, umieszczonego w erlenmayerce na 300 cm³. Ten roztwór buforowy zawiera 9,85 g/litr kwasu octowego lodowatego i 4,9 g/litr octanu sodowego. Wartość pH wynosi 4,0. Roztwór zawiera ponadto 6,45 g/litr chlorowodoru czystej spiramycyny I i 1 g/litr chlorku kobaltowego sześciowodnego. Erlenmayerkę zawierającą zawieszinę grzybni poddaje się inkubacji w temperaturze 25°C na wstrząsarce w ciągu 80 godzin. Następnie zawartość erlenmayerki analizuje się za pomocą chromatografii bibułowej. Znajduje się, że 2,4 g/litr spiramycyny I zostało przekształcone w mieszaninę zawierającą 90% spiramycyny II i 10% spiramycyny III.

P r z y k ł a d XVI. W zbiorniku fermentacyjnym na 170 litrów umieszcza się kolejno następujące składniki pożywki:

namoku kukurydzianego (50% suchej substancji)	4800 g
skrobi	2400 g
chlorku sodowego	600 g
siarczanu magnezowego	120 g
fosforanu jednopotasowego	240 g
wody wodociągowej	100 litrów.

Wartość pH doprowadza się do 6,7 za pomocą 730 cm³ ługu sodowego o zawartości NaOH 400 g/litr. Następnie dodaje się:

węgla wapniowego	600 g
oleju sojowego	60 cm ³
silikonowego środka przeciw pianowego	60 cm ³ .

Zbiornik fermentacyjny i jego zawartość sterylizuje się parą za pomocą bełkotki przez 40 minut w temperaturze 122°C, co prowadzi do końcowej objętości 120 litrów. Po oziębieniu i doprowadzeniu do temperatury 25°C zawartość zbiornika fermentacyjnego zaszczepia się 250 cm³ hodowli zaszczepiającej przygotowanej jak w przykładzie IV, miesza się z szybkością 350 obrotów/min. i napowietrza 5 m³ powietrza. Po 25 godzinach hodowli rozwój *S. ambofaciens* jest obfity.

Osobno w zbiorniku fermentacyjnym na 30 litrów umieszcza się:

chlorku amonowego	150 g
glukozy uwodnionej	750 g
wody wodociągowej	14 litrów.

Zbiornik fermentacyjny i jego zawartość sterylizuje się przez 40 minut w temperaturze 122°C. Po oziębieniu i doprowadzeniu do temperatury 25°C dodaje się 375 g węgla wapniowego zawieszzonego w 2 litrach wody i sterylizowanego, co odpowiada objętości pożywki do 15 litrów. Wartość pH wynosi 7,5.

Zawartość tego zbiornika zaszczepia się 1,5 litra 23-godzinnej hodowli zaszczepiającej ze zbiornika fermentacyjnego na 170 litrów opisanej poprzednio, miesza za pomocą śmigła obracającego się z szybkością 550 obrotów/min. i napowietrza stosując 1 m³ powietrza na godzinę. Po 48 godzinach hodowli *S. ambofaciens* wykazuje dobry rozwój, a wartość pH podłoża wynosi 6,5. Dodaje się wówczas do niego roztworu wodnego składającego się ze:

spiramycyny w postaci zasady	150 g
propionianu sodowego	19 g
chlorku kobaltowego sześciowodnego	17 g
normalnego roztworu kwasu propionowego	300 cm ³
wody destylowanej	1000 cm ³ .

Stosowana zasada spiramycyny jest produktem surowym, zawierającym 65%, 23% i 12% spiramycyny I, II i III. Dalszą hodowlę prowadzi się w tych samych jak poprzednio warunkach temperatury, mieszania i napowietrzania w ciągu 90 godzin. Po tym czasie zbiornik fer-

mentacyjny opróżnia się otrzymując 13,75 litrów bulionu. Chromatografia bibułowa wykazuje, że cała spiramycyna I została przekształcona w mieszaninę spiramycyny II i III, przy czym ilościowy stosunek ich w produkcie końcowym wynosi 29% i 71%.

Estrakcja bulionu pozwala na otrzymanie 122 g spiramycyny w postaci zasady składającej się z 25% spiramycyny II i 75% spiramycyny III.

Z a s t r z e ż e n i a p a t e n t o w e

1. Sposób wytwarzania spiramycyny III przez fermentację za pomocą *S. ambofaciens*, znamienny tym, że do środowiska hodowli do-

daje się czynnika propionylującego, takiego jak kwas propionowy lub jego pochodne, albo propanolu.

2. Odmiana sposobu według zastrz. 1 wytwarzania spiramycyny III i spiramycyny II lub ich mieszaniny, znamienna tym, że fermentację za pomocą *S. ambofaciens* prowadzi się w środowisku, do którego dodaje się spiramycyny I i czynników propionylujących lub acetylujących.

S o c i é t é d e s U s i n e s C h i m i q u e s
R h ô n e - P o u l e n c

Zastępca: mgr Józef Kamiński,
rzecznik patentowy