

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

48394

Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 18.IX.1961 (P 97 340)

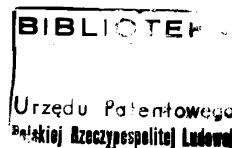
Pierwszeństwo: 21.IX.1960 dla zastrz. 1
15.VI.1961 dla zastrz. 2—7
Wielka Brytania

Opublikowano: 10.VIII.1964

Kl. 30h 6

MKP C 12 d 9/20

UKD



Współtwórcy wynalazku: inż. Wagn Ole Godtredson, mgr Henning Otto
Bojsen Lorek, inż. Sverre Jahnsen

Właściciel patentu: Knud Abildgaard trading as Ævens Kemiske Fabrik
Ved A. Kongsted, Bellerup (Dania)

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku i jego soli

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania nowego antybiotyku, który w opisie niniejszym nazywany będzie antybiotykiem ZN-6 oraz jego soli.

Antybiotyk ZN-6 jest słabym kwasem, tworzącym sole z nieorganicznymi lub organicznymi zasadami. Ponadto stwierdzono, że tworzy on solwaty z szeregiem rozpuszczalników.

Według wynalazku, nowy czynny jako antybiotyk związek, lub jego sole, mogą być wytworzone w postaci rozcieńczonych roztworów lub surowych koncentratów, jak również w czystej krystalicznej postaci lub w postaci krystalicznych solwatów.

Istota wynalazku dotyczy sposobu fermentacji grzyba *Fusidium coccineum* Fuck K. Tubaki do chwili, gdy wytworzy wystarczająco dużą ilość antybiotyku ZN-6, jak również wyodrębniania, przetwarzania w odpowiednie sole lub solwaty, a także sposobu zagęszczania, oddzielania, krystalizacji lub oczyszczania antybiotyku ZN-6, względnie jego soli i solwatów w celu otrzymania jednej z pożądanych postaci, które zostały wyżej opisane.

Organizm produkujący antybiotyk ZN-6 można otrzymać z Centralbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holandia. Szczep jest zaklasyfikowany do gatunku *Fusidium coccineum*, a synonimem jego

2

jest *Ramularia coccinea*. Rodzaj *Fusidium* należy do szczepu *Oosporeae*, rodziny *Mucedinaceae* i rzędu *Hyphomycetales*.

Antybiotyk ZN-6 jest słabym kwasem karboksylowym. Elektrometrycznym miareczkowaniem w środowisku 80% alkoholu stwierdzono, że jego pK_a wynosi 7.25, co odpowiada $pK_a = 5.3$ w środowisku wodnym. Ponadto badania miareczkowe wskazują, że ciężar równoważnikowy tej substancji wynosi 516.

Badania dotyczące chemicznej struktury, jak również dane analityczne wskazują, że substancja ta ma wzór sumaryczny $C_{31}H_{48}O_6$ i zawiera w cząsteczce układ pierścieni cyklopentenopolihydrofenantrenu, podstawiony dwoma grupami hydroksylowymi, jedną grupą acetoksyłową i czterema grupami metylowymi i który w pozycji 17 połączony jest podwójnym wiązaniem z atomem węgla w położeniu α -kwasu 5-metylo-4,5-heptenowego.

Do tej pory wzór strukturalny antybiotyku ZN-6 nie został dokładnie ustalony, lecz wydaje się, że substancja posiada wzór przedstawiony na rysunku, w którym faliste linie wskazują miejsca, w których konfiguracja nie jest pewna.

Antybiotyk ZN-6 jest mało rozpuszczalny w wodzie, jest on natomiast rozpuszczalny w etanolu,

acetonie, ketonie metylo-*o*-butylowym, octanie amylu, chloroformie i podobnych rozpuszczalnikach.

Przy chromatografii bibułowej, stosując technikę opisaną przez Busha (Biochemical Journal, tom 50, (1952), strona 370) antybiotyk ZN-6 wykazuje wartości $R_f = 0.38$ i 0.73 odpowiednio przy technice B (1) i B (5).

Z benzenem tworzy krystaliczny solwat benzenowy, który rozpuszczalny jest w gorącym benzynie, natomiast jest mało rozpuszczalny w zimnym benzynie. Solwat ten ma temperaturę topnienia $189-189,5^\circ$. Po osuszeniu go przy temperaturze 50° i ciśnieniu $0,01$ mm słupa rtęci do stałej wagi otrzymuje się czysty produkt, nie zawierający benzenu o temperaturze topnienia $191-192^\circ$, skręcalności właściwej $[\alpha]_D^{22} = -9$ w 1%-owym roztworze chloroformowym i współczynniku ekstynkcji molowej przy długości fali świetlnej $220\text{ m}\mu$ wynoszącym 8000 w etanolu jak również braku charakterystycznych linii absorpcji powyżej tej długości fali.

Czysty antybiotyk ZN-6 wykazuje ponadto charakterystyczne widmo w podczerwieni, jak to uwidoczono na wykresie. Z wykresu tego wynika, że wykazuje on charakterystyczne linie absorpcyjne dla następujących częstotliwości, wyrażonych w cm^{-1} : 1265 , 1385 , 1695 , 1730 i 3450 , stosując w tym przypadku technikę z bromkiem potasowym.

Z badań bakteriologicznych wynika, że antybiotyk ZN-6 jest aktywny wobec szeregu chorobotwórczych drobnoustrojów, a zwłaszcza wobec *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, włączając w to również szczepy penicylinoodporne, *Neisseria meningitides*, *Mycobacterium tuberculosis*, oraz szczepy odporne przeciw streptomycynie, hydrazydowi kwasu izonikotynowego lub kwasowi *p*-aminosalicylowemu, jak również przeciw *Corynebacterium diphtheriae*.

Bardziej szczegółowo przedstawiono aktywność antybiotyku ZN-6 przeciwko grzybom i bakteriom w załączonej tabeli, w której aktywność jest wyrażona jako ilość soli sodowej antybiotyku ZN-6 w miligramach na litr, która wywołuje 50% zahamowania wzrostu badanych drobnoustrojów w czasie podanym w godzinach.

Tabela 1 /

Drobnoustrój	Pożywka	Czas	Aktywność
<i>Staphylococcus aureus</i>	bulion	24	0.063
<i>Staphylococcus aureus</i> , szczep wytwarzający penicylinazę	"	24	0.050
<i>Staphylococcus aureus</i> , szczep laboratoryjny odporny na penicylinę, nie wytwarzający penicylinazy	"	48	0.16
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	agar z krwinkami	24	0.32

	Drobnoustrój	Pożywka	Czas	Aktywność
5	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , szczep odporny na penicylinę	agar z krwinkami	24	0.63
	<i>Neisseria meningitides</i>	"	24	0.32
10	<i>Haemophilus influenzae</i>	"	24	10.0
	<i>Diplococcus pneumoniae</i>	bulion z 50% surowicy	24	16.0
15	<i>Streptococcus pyogenes</i>	"	24	3.2
	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	"	24	2.5
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	"	24	18.0
20	<i>Streptococcus lactis</i>	"	24	13.0
	<i>Streptococcus faecalis</i>	"	24	5.0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	bulion	24	>30.0
25	<i>Vibrio comma</i>	"	24	>30.0
	<i>Alicycigenes faecalis</i>	"	24	13.0
	<i>Escherichia coli</i>	"	24	>30.0
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	"	24	>30.0
30	<i>Serratia marcescens</i>	"	24	>30.0
	<i>Proteus vulgaris</i>	"	24	>30.0
	<i>Salmonella typhimurium</i>	"	24	>100.0
35	<i>Bacillus subtilis</i>	"	24	1.6
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> var. hum.	Dubos	144	0.79
40	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> var. hum., szczep odporny na działanie streptomycyny	"	144	1.6
45	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> var. hum., szczep odporny na kwas <i>p</i> -aminosalicylowy	"	144	1.6
50	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> var. hum., szczep odporny na hydrazyd kwasu izonikotynowego	"	240	0.50
	<i>Candida albicans</i>	Sabourauds	24	100.0
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	"	72	100.0
55	<i>Aspergillus niger</i>	"	72	100.0
	<i>Clostridium perfringens</i>	pożywka tioglikolanowa	48	0.25
60	<i>Clostridium tetani</i>	"	48	0.02
	<i>Actinomyces bovis</i>	"	48	0.05
65	<i>Corynebacterium pyogenes</i>	bulion z mięsa z 10% surowicy	24	0.05

Badania kliniczne wykazały, że antybiotyk ZN-6 i kilka jego soli odpowiada wymaganiom stawianym antybiotykowi stosowanemu w farmacji. Mogą one być użyte przy leczeniu chorób zakaźnych, a zwłaszcza przy leczeniu chorób wywołanych przez rozmaite szczepy *Staphylococcus*, włączając w to szczepy odporne na działanie penicyliny.

W farmacji antybiotyk może być stosowany w postaci czystej lub w postaci mniej lub więcej rozpuszczalnych w wodzie soli z nietoksycznymi organicznymi lub nieorganicznymi zasadami.

Wodne roztwory soli antybiotyku ZN-6 mogą być stosowane pozajelitowo. Stosowanie doustne jest jednak najkorzystniejsze, ponieważ sole te łatwo przechodzą z przewodu żołądkowo-jelitowego do płynów ustrojowych, w których odpowiednie stężenie antybiotyku można stwierdzić przez wystarczająco długi okres czasu. Fakt ten ustalono w badaniach resorpcji, w których 7 osobom podawano doustnie pojedynczą dawkę w dwóch kapsułkach, przy czym każda z nich zawierała 0.250 g soli sodowej antybiotyku ZN-6. Stężenie antybiotyku w płazmie było badane po ściśle określonych okresach od momentu podania leku. Wyniki uzyskane uwidoczniło w tabeli 2, której liczby podają stężenie antybiotyku w płazmie, wyrażone w mikrogramach na ml plazmy po godzinie lub kilku godzinach od jego podania.

Tabela 2

Osoba/godziny	1	2	3	4	7	9	12
A	1.6	9.5	7.2	5.5	2.9	2.1	1.5
B grupa I	0.9	1.2	3.0	2.7	3.6	3.1	2.2
C	0.6	10.0	6.1	6.1	5.2	4.0	2.2
D	0.8	11.0	8.5	9.3	5.2	4.7	1.7
E	1.6	6.6	8.1	6.6	4.0	3.2	2.4
F grupa II	0.6	1.7	7.5	6.1	3.4	3.0	2.4
G	2.5	12.3	8.6	6.7	3.5	3.1	1.8

W grupie I podawano pacjentom antybiotyk na czczo, podczas gdy w grupie II podawano go po posiłku.

W podobnym tekście stężenie antybiotyku w płazmie po 24 godzinach od chwili podania takiej samej ilości antybiotyku wynosiło 0.75 mikrogramów na mililitr, co wskazuje na bardzo powolne wydzielanie leku z organizmu.

Zaobserwowano również wystarczająco małą toksyczność antybiotyku ZN-6 przy doświadczeniach przeprowadzanych na myszach. Niżej podane wartości LD₅₀ wyrażone są w miligramach na kg wagi zwierząt:

- Sól sodowa antybiotyku ZN-6 podawana dożylnie 200—250;
- Sól sodowa antybiotyku ZN-6 podawana podskórnie 400;
- Solwat benzynowy antybiotyku ZN-6 podawany doustnie > 1500.

Ponadto w długotrwałych badaniach toksykologicznych, w których zwierzętami doświadczalnymi były szczury rodzaju męskiego i żeńskiego, podawano doustnie sól sodową antybiotyku ZN-6

w ilości 0,400 g na kg wagi zwierząt przez 6 dni. W wyniku tych badań nie stwierdzono istotnych różnic wagi między badanymi zwierzętami a grupą kontrolną jak również żadnych patologicznych zmian wywołanych lekiem. Wskazuje to na brak toksyczności chronicznej.

Niespotykane dotąd właściwości antybiotyku ZN-6 zostały stwierdzone podczas klinicznych badań kontrolnych przeprowadzonych z solą sodową tego antybiotyku w postaci odpowiedniej mieszaniny umieszczonej w kapsułkach żelatynowych. Podawano ją doustnie pacjentom cierpiącym na furunculosis, osteomyelitis i endocarditis. W wyniku przeprowadzonych badań w odstępach około jednodniowych stosownie do praktyki lekarskiej, podczas dostatecznie długiego czasu w 100% przypadków nie stwierdzono żadnych ubocznych objawów lub objawów toksycznych, jak również nie zaobserwowano niekorzystnych skutków nawet po dłuższym okresie czasu.

Oprócz rozpuszczalnych w wodzie soli antybiotyku ZN-6, a zwłaszcza soli sodowej do celów klinicznych nadają się również mało rozpuszczalne w wodzie sole antybiotyku ZN-6 lub też sam wolny kwas, stosowane doustnie. Stopień resorpcji leku jest wówczas tak mały, że aktywność leku objawia się głównie w przewodzie żołądkowo-jelitowym, co jest pożądane przy leczeniu niektórych chorób. Ponadto mało rozpuszczalne w wodzie sole antybiotyku ZN-6 mogą być wstrzykiwane pod postacią zawiesiny w odpowiednim ośrodku w celu osiągnięcia dłuższych czasów utrzymywania pożądanego poziomu antybiotyku we krwi.

Według wynalazku, grzyb *Fusidium coccineum* Fuck K. Tubaki hoduje się w warunkach aerobowych w środowisku zawierającym węglowodan, źródło azotu, tj. białka, jak również odpowiednie ilości nieorganicznych soli i innych substancji, niezbędnych do odżywiania grzyba. Fermentację prowadzi się do osiągnięcia odpowiedniej aktywności antybiotyku w wyżej wymienionym środowisku, po czym wytworzony antybiotyk ZN-6 wyodrębnia się, zagęszcza i wydziela w postaci czystej lub przeprowadza w sole za pomocą znanych reakcji z nadającymi się do celów farmaceutycznych zasadami.

Podczas przebiegu procesu według wynalazku, ilość wytworzonego antybiotyku jest określana w czasie fermentacji za pomocą znanych prób analitycznych na aktywność przesączu z kultury. Stosuje się do tego celu płytki z agarom, używając jako drobnoustrój testowy *Staphylococcus aureus*.

Na podstawie prób, przeprowadzanych w czasie produkcji antybiotyku ZN-6 na skalę techniczną stwierdzono, że największą jego wydajność osiąga się poczynawszy od 80—100 godzin fermentacji, prowadzonej przy temperaturze 20—30°, a zwłaszcza 24—28°.

Proces prowadzono w tankach przemysłowych o pojemności 10—30 m³ kultury.

Stwierdzono, że jako pożywki do kultury produkcyjnej nadają się różne znane pożywki — jako źródło białka wyciąg ze zboża lub mączka sojowa, a jako źródło węglowodanów — glukoza lub sacharoza. Jako dalsze składniki pożywki należy wy-

mienieć wyciąg z drożdży, glicerynę, maltozę, fruktozę, kwasy tłuszczowe, hydrolizat kazeinowy, niektóre aminokwasy i rozpuszczalne w wodzie witaminy.

Z chwilą, gdy wytwarzanie antybiotyku podczas procesu fermentacji ustanie, lub gdy osiągnie się wystarczającą wydajność, antybiotyk wyodrębnia się różnymi metodami.

Korzystne jest oddzielenie w pierwszej kolejności grzybni od płynu kultury, zwłaszcza przez przesączenie. Antybiotyk ZN-6 można zagaścić przez traktowanie cieczy fermentacyjnej stałym adsorbentem i eluację substancji z tego adsorbenta. Do tego celu może być zastosowany adsorbent w postaci np. węgla aktywowanego lub żywicy jonowymiennej. Korzystniej jest ekstrahować ciecz pofermentacyjną za pomocą odpowiednich rozpuszczalników lub ich mieszaniny ewentualnie po nastawieniu wodnego środowiska, zawierającego antybiotyk ZN-6, do żądanej wartości pH.

Odpowiednimi rozpuszczalnikami są estry, ketony i chlorowcowane węglowodory. W produkcji na skalę przemysłową najkorzystniejsze do ekstrakcji cieczy pofermentacyjnej okazały się keton metylo-woizobutyloowy, octan amylu i octan butylu.

Z ekstraktu można wyodrębnić aktywną substancję przez odparowanie fazy organicznej od małej objętości, z której antybiotyk wytrąca się przez ochłodzenie lub przez dodanie do koncentratu składnika, który zmniejsza jego rozpuszczalność, jak również przez odparowanie fazy organicznej do suchości i dodanie benzenu w celu otrzymania łatwo krystalizującego wyżej opisanego solwatu benzenowego.

Właściwości kwasowe antybiotyku ZN-6 pozwalają wreszcie na późniejszą ekstrakcję fazy organicznej wodnym roztworem alkaliów lub wodną zawiesiną substancji alkalicznych, którą to drogą otrzymać można mniej lub więcej stężone roztwory wodne soli antybiotyku ZN-6. Przez zakwaszenie tych roztworów można wytrącić antybiotyk ZN-6 lub też jeśli jest to pożądane można zawartą w tych roztworach sól wydzielić jako taką.

Korzystnie jest wytwarzać według wynalazku łatwo krystalizujący solwat benzenowy bezpośrednio z wyżej opisanych wodnych roztworów soli antybiotyku ZN-6, ewentualnie po usunięciu części wody przez odparowanie, zwłaszcza w próżniowym aparacie destylacyjnym. Wykonuje się to przez dodanie do zagęszczonego wodnego roztworu dostatecznej ilości benzenu, potrzebnej do tworzenia solwatu i zakwaszenie w celu wytrącenia antybiotyku ZN-6 w postaci solwatu. Po oddzieleniu i osuszeniu stanowi on czysty solwat benzenowy lub sam antybiotyk ZN-6 zależnie od warunków suszenia. Benzen może zostać oddzielony od solwatu przez suszenie w podwyższonych temperaturach.

Dla oczyszczania antybiotyku ZN-6 duże znaczenie posiada jego zdolność tworzenia solwatu z niektórymi rozpuszczalnikami. Tak więc według dalszej korzystnej odmiany sposobu według wynalazku surowy antybiotyk może zostać rozpuszczony w małej objętości metanolu, z której wytrąca się po ochłodzeniu krystaliczny solwat metanolowy o nadspodziewanie wysokiej czystości. Z tego

względem metoda ta szczególnie dobrze nadaje się do wytwarzania antybiotyku dla celów farmaceutycznych. Solwat metanolowy posiada temperaturę topnienia 179—179,5°.

Sole antybiotyku ZN-6, mogą być otrzymane przez proste zobojętnienie antybiotyku ZN-6 lub jednego z jego solwatów za pomocą odpowiedniej zasady, w odpowiednim środowisku, ułatwiającym reakcję i z którego sól wytrąca się, albo jeśli to potrzebne, wytrącana być może przez dodanie odpowiedniego składnika, zmniejszającego rozpuszczalność tej soli lub też może być izolowana przez odparowanie środowiska reakcji.

Można również uprzednio wytworzoną sól antybiotyku ZN-6 poddać reakcji z żadaną zasadą lub też żadana sól antybiotyku ZN-6 może być wytworzona przez podwójny rozkład uprzednio wytworzonej soli antybiotyku ZN-6 i innej soli zawierającej pożądany jon metalu lub zasadę.

W ten sposób wytwarza się sole rozpuszczalne w wodzie, a mianowicie: sól sodową, potasową, amonową, trójmetyloaminy, piperydiny, morfoliny, cykloheksyloaminy i monoetanolaminy, jak również mało rozpuszczalne w wodzie sole wapnia, magnezu, dwubenzylodwumaminy, benzyl-β-feniloetyloaminy i prokainy.

Odnosnie innych soli, które mogą być wytworzone według wynalazku, należy wymienić sole zawierające jako składnik zasadowy: pirolidynę, piperazynę, guanidynę, metyloaminę, etyloaminę, benzylaminę lub podobne niepodstawione lub podstawione aminy, ponadto aminy czwartorzędowe jak cholinę i jej pochodne lub inne antybiotyki wykazujące własności zasadowe, jak np. streptomycyny.

Wynalazek objaśniają niżej podane przykłady.

Przykład I. Solwat benzenowy antybiotyku ZN-6. Do tanku fermentacyjnego o pojemności 1,5 m³ wykonanego ze stali nierdzewnej i zaopatrzonego w mieszadło wprowadzono 1.00 m³ pożywki o następującym składzie:

glukoza	20.0 kg
mączka mięsna i kostna	20.0 „
wyciąg zbożowy (50% suchej masy)	2.5 „
gliceryna	7.5 „
sól kuchenna	4.0 „
MgSO ₄	0.05 „
woda wodociągowa	do 1000 l

Pożywka miała wartość pH = 6.1, którą skorygowano do pH = 6.5 przez dodanie rozcieńczonego roztworu ługu sodowego, po czym pożywkę sterylizowano przez ogrzanie. Po ochłodzeniu zaszczepiano ją trzema litrami kultury *Fusidium coccineum* Fuck K. Tubaki, rozmnażanej przez 48 godzin we wstrząsanej przy temperaturze 28° kolbie. Zawartość tanku mieszano i napowietrzano 0.6 m³ powietrza na godzinę przy 28° podczas 56 godzin. Wartość pH w tym czasie wynosiła 6.5. Po upływie tego okresu fermentacji określano aktywność antybiotyku w masie kultury za pomocą próby na płycie z agarem przy użyciu bakterii *Staphylococcus aureus*. Aktywność ta odpowiadała 70 mg an-

tybiotyku ZN-6 na litr w porównaniu z aktywnością antybiotyku, badanego tą samą metodą.

Następnie grzybnę oddzielano od środowiska przez filtrację, przy czym ilość przesączu wynosiła 700 litrów. Wartość pH środowiska nastawiano na 3.3 przez dodanie 25%-owego roztworu kwasu siarkowego, poczym przesącz ekstrahowano 230 litrami octanu butylu w przeciwprądzie w ekstraktorze Poddzielniaka. Fazę octanu butylu ekstrahowano następnie 77 litrami wody, do której dodano 10%-owy roztwór ługu sodowego aż do uzyskania wartości pH wynoszącej 10, poczym wodną fazę oddzielano od fazy octanu butylu. Wartość pH fazy wodnej nastawiano na 3.2 przez dodanie 25%-owego roztworu kwasu siarkowego, a tak otrzymany roztwór ekstrahowano 40 litrami ketonu metyloizobutyloвого. Fazę ketonu metyloizobutyloвого oddzielano od fazy wodnej, traktowano 40 g węgla aktywowanego a następnie odparowywano do suchości pod próżnią przy temperaturze wrzenia 25°. Pozostałość rozpuszczano w 500 ml benzenu, a roztwór ten pozostawiano przez noc w lodówce. W tym czasie wykrywał solwat benzenowy antybiotyku ZN-6. Solwat ten odsączano i rekrytalizowano z benzenu, otrzymując 12.0 g czystej substancji o temperaturze topnienia wynoszącej 189—189.5°.

Przykład II. Sól sodowa antybiotyku ZN-6. 500 mg solwatu benzenowego wytworzonego według przykładu I zawieszano w 200 ml wody, a do tej zawiesiny dodawano 1/2 N normalnego wodnego roztworu ługu sodowego aż do osiągnięcia wartości pH = 9.0. Roztwór przesączono i do przesączu dodano 50 ml n-butanolu, po czym z roztworu usunięto wodę przez destylację azeotropową pod próżnią. Z pozostałości wytrącono żądaną sól sodową przez dodanie eteru. Osad odsączono, przemyto eterem i wysuszono. Przez rekrytalizację z mieszaniny etanolu i acetonu otrzymano 360 mg czystej krystalicznej soli sodowej.

Przykład III. Wytwarzanie antybiotyku ZN-6. Spory *Fusidium coccineum* Fuck K. Tubaki przeszczepiano z agaru skośnego do trzech litrów sterylnej pożywki o następującym składzie:

gliceryna	7.5	g na litr
wyciąg ze zboża	2.5	g „ „
glukoza	10.0	g „ „
KH_2PO_4	0.6	g „ „
mączka sojowa	3.0	g „ „
sól kuchenna	4.0	g „ „
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	g „ „
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.005	g „ „
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.004	g „ „

Kulturę inkubowano w warunkach aerobowych przy temperaturze 27° podczas 40—60 godzin we wstrząsarce. Tak wytworzoną kulturę zastosowano bezpośrednio jako inokulum do fermentacji na skalę przemysłową, w omawianym przypadku wprowadzono ją do zbiornika o pojemności 700 litrów, zawierającego pożywkę taką samą jak pożywka stosowana przy fermentacji na skalę prze-

mysłową i inkubowano przy temperaturze 26° przez 40—48 godzin w celu rozmnożenia grzyba przed zaszczepieniem w głównym tanku fermentacyjnym.

Następnie przygotowano 16.000 litrów pożywki o następującym składzie:

glukoza	30	g na litr
gliceryna	5	g „ „
$\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5	g „ „
NaNO_3	6	g „ „
KCl	0.5	g „ „
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	g „ „
$\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1	mg „ „
ekstrakt drożdżowy	0.12	g „ „

Pożywkę tę przed sterylizacją nastawiano na wartość pH = 7.2 i sterylizowano w tanku fermentacyjnym przy temperaturze 120° przez pół godziny, a po ochłodzeniu zaszczepiano jednym z dwóch wyżej wymienionych rodzajów inokulum. Fermentację prowadzono podczas mieszania i przepompowywania przez ciecz powietrza przepuszczonego przez iskrownik w ilości 0.5 litra powietrza na litr kultury na minutę. Grzybnę wytwarzano w ten sposób przy temperaturze 26° przez 4 dni.

Aktywność prób przesączu z kultury określano przez pomiar strefy zahamowania na płytce agarowej, w której drobnoustrojem testowym był *Staphylococcus aureus*. Po zakończeniu procesu aktywność kultury odpowiadała stężeniu antybiotyku ZN-6 wynoszącym 150 µg na ml.

Przykład IV. Wytwarzanie antybiotyku ZN-6. Sporządzono 16.000 litrów pożywki o następującym składzie:

wyciąg ze zboża, 50%	2.5	g na litr
mączka sojowa lub mączka mięsna	10.0	g „ „
sacharoza	30.0	g „ „
gliceryna	7.5	g „ „
sól kuchenna	4.0	g „ „
KH_2PO_4	0.5	g „ „
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	g „ „

Pożywkę tę przed sterylizacją nastawiano na wartość pH = 6.80, a następnie sterylizowano w tanku fermentacyjnym przy temperaturze 120° przez pół godziny. Po ochłodzeniu zaszczepiano ją za pomocą inokulum opisanego w przykładzie III i fermentowano przez 100 godzin, po którym to czasie stężenie antybiotyku w kulturze wynosiło 260 µg, jak to stwierdzono za pomocą próby na agarze.

Przykład V. Wytwarzanie antybiotyku ZN-6 16.000 litrów pożywki o następującym składzie:

sacharoza	60.0	g na litr
wyciąg ze zboża	20.0	g „ „
KH_2PO_4	10.0	g „ „
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5	g „ „

którą nastawiano na wartość pH = 6.8 sterylizowano w tanku fermentacyjnym przy temperaturze 120° przez pół godziny, a po ochłodzeniu zaszczepiano

piano za pomocą inokulum opisanego w przykładzie III. Po fermentacji przez okres 100 godzin, w warunkach zbliżonych do warunków podanych w przykładzie III uzyskiwano wydajność antybiotyku do 250 μg na litr kultury. Sklarowany płyn po fermentacji (15.000 litrów, zawierający 3.75 kg antybiotyku ZN-6, jak to stwierdzono za pomocą metody na płycie agarowej), doprowadzono do wartości $\text{pH} = 6$ i ekstrahowano w ekstraktorze Podbielniaka za pomocą 3.000 litrów ketonu metylowoizobutyloвого. Wyciąg zawierający 3.4 g antybiotyku ZN-6 ekstrahowano następnie 600 litrami wodnego roztworu ługu sodowego o wartości $\text{pH} = 11.5$. Natychmiast po ekstrakcji fazę wodną nastawiono na wartość $\text{pH} = 9.3$ i odparowano pod próżnią do objętości 150 litrów, zawierającej 3,25 kg antybiotyku ZN-6.

Do tego koncentratu dodano 40 litrów benzenu i nastawiono podczas mieszania wartość pH fazy wodnej na 5.0 przez dodanie kwasu solnego. Mieszanie kontynuowano przez 4 godziny, po którym to czasie osad składający się z solwatu benzenowego antybiotyku ZN-6 odsączono, przemyto wodą i benzenem i wysuszono. Surowy produkt (2.8 kg) rozpuszczono w 12 litrach chlorku metylenu, przesączono i odparowano do suchości pod próżnią. Pozostałość rozpuszczono w 3.2 litrach gorącego metanolu, po czym po ochłodzeniu do 0° wykrystalizowano solwat metanolowy, który przemyto trzykrotnie 300 ml lodowatego metanolu i wysuszono, uzyskując 2,48 kg bezbarwnego solwatu metanolowego.

Produkt ten zawieszono w mieszaninie 750 ml metanolu i 1750 ml acetonu, a po dodaniu kilku kropli wskaźnika — fenoltaleiny dodano 33%-owy wodny roztwór wodorotlenku sodowego i mieszano aż do osiągnięcia delikatnie czerwonego zabarwienia. Tak uzyskany roztwór przesączono przez ziemię okrzemkową (dicalite) zmieszano z 5 litrami ketonu metylowoizobutyloвого i zagęszczono pod próżnią do objętości 3 litrów. Podczas zagęszczania wykrystalizowywała sól sodowa. Sól tę odsączono, przemyto acetonem a następnie eterem i wysuszono, uzyskując 2.35 g czystej soli sodowej.

Przykład VI. Sole antybiotyku ZN-6 z zasadami organicznymi.

Do roztworu 517 mg antybiotyku ZN-6 w 5 ml acetonu dodano 1 milimol zasady organicznej i 2.5 ml heksanu i przez pocieranie naczynia spowodowano krystalizację soli. Sól oczyszczono przez rekrytalizację z odpowiedniego rozpuszczalnika.

zasada	rekrytalizowana	temp.
	z	top. $^\circ\text{C}$
trójetyloamina	aceton	143—144
piperydyna	"	155—156
morfolina	"	112—114
cykloheksyloamina	"	180—182
dwubenzylloetylenodwuamina*)	octan etylu	112—113
benzyllo- β -fenyloetyloamina*)	aceton-heksan	103—105
monoetanoloamina	" "	130—132
prokaina*)	" "	bezpostaciowa

*) mało rozpuszczalne w wodzie

Przykład VII. Oddzielanie antybiotyku od cieczy fermentacyjnej.

200 ml żywicy jonowymiennej Amberlit IRA 401 S(OH) mieszano przez dwie godziny z trzema dwulitrowymi porcjami sklarowanej cieczy fermentacyjnej, zawierającej 110 γ antybiotyku ZN-6 na ml. Podczas mieszania utrzymywano pH na poziomie 9.5 przez dodawanie 2n wodnego roztworu ługu sodowego.

Analiza przesączu wykazała, że 85% antybiotyku ZN-6 zostało zaabsorbowane na żywicy. Po przesączeniu żywicę przemyto trzema porcjami wody po 1.5 litra każda, a następnie zawieszono w 500 ml acetonu. Obniżano pH do wartości 3.6 podczas mieszania w ciągu trzech godzin przez dodawanie 6n kwasu solnego, po czym odsączono żywicę i przemyto acetonem (2×100 ml). Połączone wyciągi i płyny po przemyciu zawierały 375 ml antybiotyku ZN-6, co odpowiada 57% ilości zawartej w cieczy pofermentacyjnej.

Przykład VIII. Oddzielanie antybiotyku od cieczy fermentacyjnej.

1 litr sklarowanej cieczy zawierający 500 mg antybiotyku ZN-6 mieszano przez jedną godzinę z 5 g węgla odbarwiającego (S.E.C.A.III) i przesączono. Przesącz zawierał mniej niż 25 mg antybiotyku ZN-6. Osad przemyto wodą a następnie ogrzewano pod chłodnicą zwrotną z 100 ml metanolu przez dwie godziny, ochładzano i przesączano. Przesącz zawierał około 150 mg antybiotyku ZN-6.

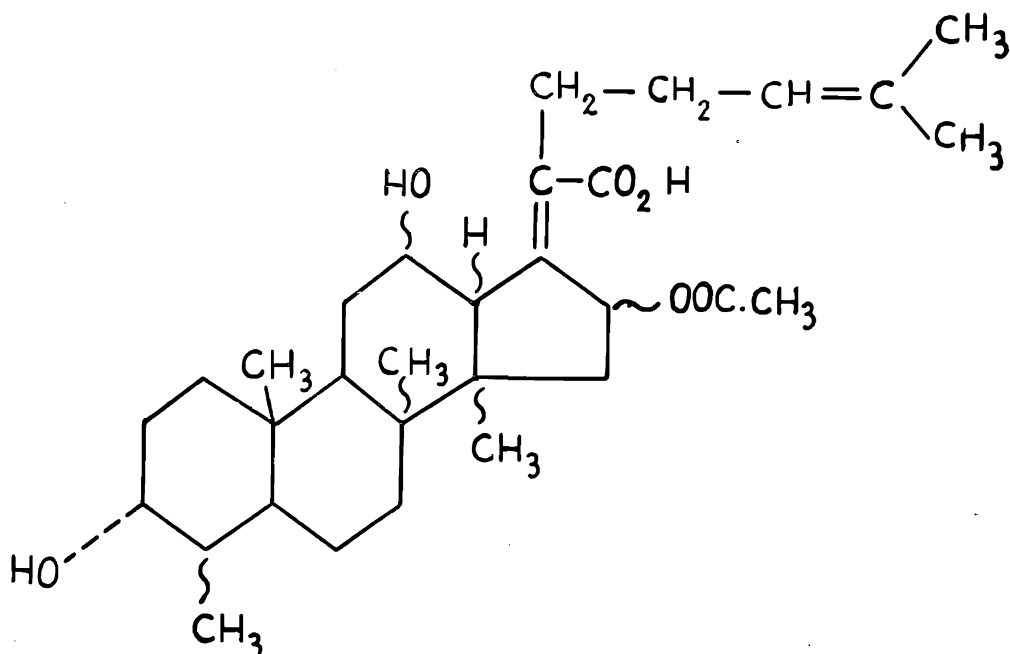
Zastrzeżenia patentowe

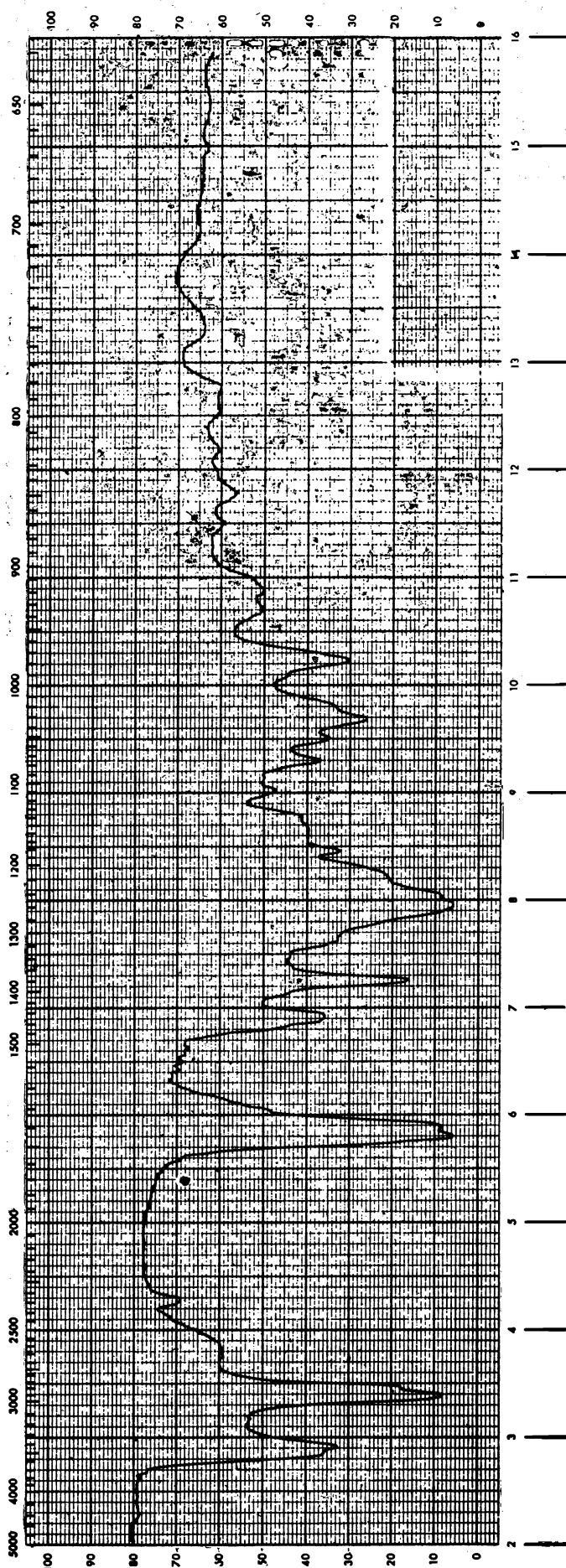
1. Sposób wytwarzania nowego antybiotyku lub jego soli, znamieny tym, że grzyb *Fusidium coccineum* Fuck K. Tubaki hoduje się w warunkach aerobowych w środowisku zawierającym węglowodany, źródło azotu i odpowiednie ilości soli nieorganicznych i innych substancji potrzebnych do jego rozwoju, przy czym proces ten prowadzi się w temperaturze $20-30^\circ\text{C}$ przez 2—7 dni do momentu uzyskania wystarczająco dużej aktywności antybiotyku, po czym tak wytworzony antybiotyk wyodrębnia się, zagęszcza, i odizolowuje w postaci czystej lub przeprowadza w sól za pomocą znanych reakcji.
2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że jako źródło azotu stosuje się wyciąg ze zboża, mączkę sojową, mączkę mięsną i kostną.
3. Sposób według zastrz 1 i 2, znamieny tym, że antybiotyk wyodrębnia się za pomocą adsorbenta, zwłaszcza węgla aktywowanego lub żywicy jonowymiennej, oddziela adsorbent ze środowiska oraz eluuje antybiotyk i wydziela produkt z eluatu.
4. Sposób według zastrz. 1 i 2, znamieny tym, że antybiotyk wyodrębnia się przez ekstrakcję za pomocą nie miesającego się z wodą rozpuszczalnika przy wartości pH poniżej 7, od którego następnie oddziela się go.

5. Sposób według zastrz. 4, znamienny tym, że fazę nie mieszającą się z wodą i zawierającą antybiotyk ekstrahuje się alkalicznym wodnym ośrodkiem, uzyskując roztwór wodny soli antybiotyku, z którego wydziela się sól lub wytrąca antybiotyk przez zakwaszenie roztworu.
6. Sposób według zastrz. 5, znamienny tym, że do wodnego roztworu soli antybiotyku dodaje się

benzenu w ilości co najmniej wystarczającej do utworzenia solwatu antybiotyku, po czym mieszaninę zakwasza się w celu wytrącenia solwatu antybiotyku, który się oddziela.

7. Sposób według zastrz. 3, 4 i 5, znamienny tym, że surową frakcję antybiotyku rekrytalizuje się z rozpuszczalnika, zdolnego do tworzenia solwatów z antybiotykiem.





ZG „Ruch” W-wa, zam. 608-64, nakład 200 egz.

