

2 B101125
H. P. TEL.

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

63 006

Patent dodatkowy
do patentu _____

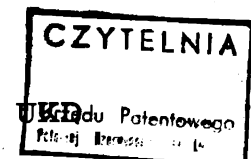
Zgłoszono: 15.V.1963 (P 101 587)

Pierwszeństwo: 18.V.1962 Francja

Opublikowano: 5.VII.1971

Kl. 30 h, 6

MKP C 12 d, 9/14



Właściciel patentu: Rhône — Poulenc S. A., Paryż (Francja)

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku

1

Przedmiotem niniejszego wynalazku jest sposób wytwarzania nowego antybiotyku, oznaczonego w dalszym ciągu numerem 13.057 RP.

Ponieważ stwierdzono, że surowemu antybiotykwowi 13.057 RP towarzyszy antybiotyk 13.213 RP w dalszej części opisu, dla uproszczenia, antybiotyk 13.057 RP zawierający antybiotyk 13.213 RP oznaczono numerem 9.865 RP.

Antybiotyk 13.057 RP jest szczególnie ważny ze względu na bardzo zdecydowane działanie antyrakowe. Antybiotyk ten odznacza się ponadto silnym działaniem bakteriobójczym zarówno na drobnoustroje Gram dodatnie, jak i na Gram ujemne. Ta właściwość ma tym większe znaczenie, że antybiotyk ten zachowuje silną aktywność wobec drobnoustrojów (a zwłaszcza gronkowców) uodpornionych na zwykłe antybiotyki, a nawet na niektóre antybiotyki przeciwrakowe, jak na przykład aktynomycyna i rufochromomycyna.

Ten nowy antybiotyk produkuje się przez hodowanie w odpowiednich warunkach jednego z dwóch mikroorganizmów, szczegółowo opisanych poniżej, które należą do rodzaju streptomycetes i są oznaczone jako „Streptomyces 8899” i „Streptomyces 31.723” (NRRL 3046 i NRRL 3045).

Antybiotyk 9.865 RP jest dobrze rozpuszczalny w rozpuszczalnikach zawierających chlor, jak na przykład chloroform i dwuchloroetan, względnie rozpuszczalny w wodzie zakwaszonej do wartości pH w granicach między 3 i 4, jest bardzo słabo

2

rozpuszczalny w alkoholach i praktycznie nierozpuszczalny w wodzie, benzenie i eterze.

Antybiotyk 9.865 RP zawiera węgiel, wodór, tlen i azot. Jego skład podstawowy jest następujący:

5 C—61,0% H—6,2% O—28,15% N—2,65%

Charakteryzuje się następującymi właściwościami fizycznymi: wygląd — proszek bezpostaciowy barwy czerwono-pomarańczowej, widmo w ultrafiolecie (dane uzyskane w 96% roztworze etan-

10 lowym):
maksimum absorpcji przy 236 mμ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 425

minimum absorpcji przy 245 mμ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 284

15 maksimum absorpcji przy 255 mμ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 308

minimum absorpcji przy 280 mμ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 108

maksimum absorpcji przy 290 mμ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 114

20 minimum absorpcji przy 325 mμ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 20

maksimum absorpcji przy 495 mμ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 146

przebiegię przy 533 mμ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 80

25

Widmo to jest przedstawione na fig. 1.

Widmo w podczerwieni (dane ze sprasowanej mieszaniny z bromkiem potasu): widmo to jest przedstawione w postaci wykresu na fig. 2, na której na osi rzędnych podano z jednej strony

długości fal wyrażone w mikronach (podziałka dolna), z drugiej zaś strony — częstotliwość fal na cm^{-1} (podziałka górna), natomiast na osi odciętych naniesiono % transmisji.

W tablicy I podane są główne pasma absorpcyjne widma w podczerwieni dla tego antybiotyku.

Tablica I

około 5450 F	1113 F
2925 F	1080 F
1715 F	1067 F
1615 F	1030 F
1580 F	1005 tF
1445 F	990 tF
1410 tF	około 945 p.
1377 F	917 m
1350 F	873 m
1282 tF	840 m
1260 p.	815 m
1230 F	793 m
1205 tF	764 m
około 1190 p.	około 690 m
1147 p.	

tF — bardzo silna
F — silna
m — średnia
p. — przegięcie

Antybiotyk 9.865 RP można zidentyfikować za pomocą chromatografii bibułowej. Antybiotyk chromatografuje się na papierze Arches nr 302, nasyconym roztworem buforowym fosforanu przy wartości pH = 4,8, w układzie n-butanolu nasyconego wodą przy zastosowaniu techniki spływowej. Chromatogram wywołuje się za pomocą bioautografii na płytce pożywki obsianej bakteriami *Bacillus subtilis* lub *Klebsiella pneumoniae*. Chromatogram ten wykazuje, że antybiotyk 9.865 RP zawiera substancje czynne, oznaczone 13.057 RP i 13.213 RP, których R_f wynosi odpowiednio 0,3 i 0,7.

Antybiotyk 13.057 RP może występować w postaci zasady lub soli.

Zasadowy antybiotyk 13.057 RP jest rozpuszczalny w alkoholach i w chloroformie, bardzo słabo rozpuszczalny w wodzie i ketonach, praktycznie nierozpuszczalny w benzenie i eterze.

Zasadowy antybiotyk 13.057 RP zawiera węgiel, wodór, tlen i azot. Jego skład elementarny jest następujący:

C—59,8% H—5,85% N—2,3% O—29,45%

Cechy fizyczne tej substancji są następujące: wygląd — czerwony proszek bezpostaciowy temperatura topnienia 155—170°C (rozpad) widmo w ultrafiolecie (w 96% roztworze etanolem):

maksimum absorpcji przy 236 $\text{m}\mu$ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 621
minimum absorpcji przy 245 $\text{m}\mu$ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 378
maksimum absorpcji przy 255 $\text{m}\mu$ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 426
minimum absorpcji przy 280 $\text{m}\mu$ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 122

maksimum absorpcji przy

290—295 $\text{m}\mu$ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 135

minimum absorpcji przy 325 $\text{m}\mu$ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 10

5 maksimum absorpcji przy

482—498 $\text{m}\mu$ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 230

przegięcie przy 533

— E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 127

Widmo to jest przedstawione na fig. 3.

10 Widmo w podczerwieni (ze sprasowanej mieszaniny z bromkiem potasu): widmo to jest przedstawione na fig. 4, na której podziałki są identyczne jak na fig. 2.

15 W tablicy II podane są główne pasma absorpcji infraczerwonej dla tego antybiotyku.

Tablica II

około 3450 tF	1117 F
2925 F	1090 m
1715 m	1080 m
1615 F	1068 m
1582 F	1033 m
1447 F	1010 F
1410 F	983 F
1380 F	950 f
1355 F	918 f
1282 F	867 f
1262 p.	około 840 f
1230 F	815 m
1205 F	790 m
około 1190 p.	762 m
1150 p.	

tF — bardzo silna
F — silna
m — średnia
f — słaba
p. — przegięcie

40 Antybiotyk 13.057 RP w postaci soli kwasu solnego rozpuszcza się w wodzie i alkoholach, słabo w chloroformie i praktycznie nie rozpuszcza się w benzenie i eterze.

45 Skład chlorku antybiotyku 13.057 RP jest następujący:

C—55,4% H—5,45% O—28,8% N—2,3% Cl—6,15%

Jego właściwości fizyczne są następujące: wygląd — igiełki barwy czerwono-pomarańczowej temperatura topnienia 225—230°C (rozpad)

50 skręcalność (α) $\frac{20}{D}$ = +240° (c = 1,0, metanol)

widmo w ultrafiolecie (w 96% roztworze etanolem):

55 maksimum absorpcji przy 236 $\text{m}\mu$ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 594

minimum absorpcji przy 245 $\text{m}\mu$ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 360

maksimum absorpcji przy 255 $\text{m}\mu$ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 410

60 minimum absorpcji przy 280 $\text{m}\mu$ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 118

maksimum absorpcji przy 290—295 $\text{m}\mu$ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 129

65 minimum absorpcji przy 325 $\text{m}\mu$ — E $\frac{1\%}{1\text{ cm}}$ = 10

maksimum absorpcji przy

$$482-498 \text{ m}\mu - E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 218$$

przebiegię przy 533 mμ — $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 120$

Widmo to jest przedstawione w postaci wykresu na fig. 5.

Widmo w podczerwieni (oznaczenie wykonane na pastylkach w mieszaninie z bromkiem potasu): widmo to jest przedstawione na wykresie na fig. 6, na której podziałki są takie same jak na fig. 2 i 4.

W tablicy III podane są pasma absorpcyjne w podczerwieni dla tego produktu.

Tablica III

około 3450 tF	1112 tF
około 2925 F	1080 F
1707 F	1064 F
1610 tF	1028 F
1575 tF	1000 tF
1439 tF	982 tF
1408 tF	950 m
1370 F	935 m
1350 F	912 m
1282 tF	882 m
1260 p.	867 F
1228 F	838 F
1205 tF	813 F
około 1190 p.	788 F
około 1145 p.	762 F
	około 692 m

tF — bardzo silne
F — silne
m — średnie
p. — przebiegię

Antybiotyk 13.213 RP jest dobrze rozpuszczalny w rozpuszczalnikach zawierających chlor, jak na przykład chloroform i w dwumetyloformamidzie, względnie jest rozpuszczalny w wodzie zakwaszonej do wartości pH 3—4, bardzo słabo rozpuszczalny w alkoholach i praktycznie nierozpuszczalny w wodzie, benzenie i eterze.

Składnik 13.213 RP zawiera węgiel, wodór, tlen i azot. Jego elementarny skład jest następujący:

C — 58,6% H — 6,2% N — 2,2%

Składnik ten posiada następujące cechy fizyczne: wygląd — proszek bezpostaciowy czerwono-pomarańczowy widmo w ultrafiolecie (w 96% roztworze etanolowym):

maksimum absorpcji przy 236 ...	$E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 425$
minimum absorpcji przy 245 ...	$E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 274$
maksimum absorpcji przy 255	$E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 297$
minimum absorpcji przy 280	$E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 103$
maksimum absorpcji przy 290—295	$E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 108$
minimum absorpcji przy 325	$E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 20$
maksimum absorpcji przy 480—495	$E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 155$
przebiegię przy 533	$E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 90$

Widmo to jest przedstawione na wykresie na fig. 7. Widmo w podczerwieni (oznaczenie wykonane na pastylkach w mieszaninie z bromkiem potasu): widmo to jest przedstawione na wykresie na fig. 8, na której podziałki są takie same jak na fig. 2, 4 i 6.

W tablicy IV podane są główne pasma absorpcji w podczerwieni dla tego antybiotyku.

Tablica IV

około 3450 F	około 1190 p.
około 2925 m	około 1180 p.
1715 m	1117 tF
1615 F	około 1080 F
1583 F	1032 F
około 1445 F	1008 F
1412 F	995 F
1377 F	około 837 m
1352 F	812 F
1282 F	około 796 F
1262 F	765 m
1230 F	około 690 m
1205 F	

tF — bardzo silne
F — silne
m — średnie
p. — przebiegię

Kwasowa hydroliza antybiotyku 9.685 RP powoduje jego rozpad na aminocukry i na zabarwioną grupę chromoforową, którą stanowi aglikon. Aglikon jest rozpuszczalny w alkoholach, octanie etylowym i chloroformie, słabo rozpuszczalny w benzenie i eterze i nierozpuszczalny w wodzie.

Ma on następujący skład elementarny:

C — 63,4% H — 5,7% O — 30,4% N — poniżej 0,2%

Jego cechy fizyczne są następujące:

wygląd — igielki czerwono-pomarańczowe temperatura topnienia 160°C, później 225—230°C widmo w ultrafiolecie (w 96% roztworze etanolowym):

maksimum absorpcji przy 236 mμ — $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 835$
minimum absorpcji przy 245 mμ — $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 510$
maksimum absorpcji przy 255 mμ — $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 570$
minimum absorpcji przy 280 mμ — $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 149$
maksimum absorpcji przy 290—295 mμ — $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 167$
minimum absorpcji przy 325 mμ — $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = \text{blisko } 0$
maksimum absorpcji przy 470—495 mμ — $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 272$
przebiegię przy 533 mμ — $E \frac{1\%}{1 \text{ cm}} = 145$

Widmo to jest przedstawione w postaci wykresu na fig. 9.

Widmo w podczerwieni (oznaczenie wykonane na pastylkach w mieszaninie z bromkiem potasu): widmo to przedstawione jest na fig. 10, na której podziałki są identyczne, jak na fig. 2, 4, 6 i 8.

W tablicy V podane są główne pasma absorpcyjne w podczerwieni dla tego produktu.

Tablica V

około 3430 F	1150 m
około 2910 F	1117 F
1707 F	około 1083 F
1610 tF	1065 F
1575 tF	1032 F
1440 tF	988 tF
1415 tF	941 m
1375 tF	918 m
1350 F	858 m
1275 tF	835 F
1228 tF	808 F
1210 tF	790 F
1185 p.	762 F
	737 m
	718 m
	695 F

tF — bardzo silne
F — silne
m — średnie
p. — przebiecie

Aglikon w antybiotyku 9.865 RP można zidentyfikować za pomocą kolistej chromatografii bibułowej. Wykonuje się ją na papierze Arches nr 302, nasyconym roztworem acetonu, zawierającym 20% formamidu za pomocą mieszaniny chloroformu i benzenu (2:1) nasyconej formamidem. W ten sposób udało się wykazać obecność tylko jednej substancji posiadającej współczynnik R_f — 0,86.

Działanie bakteriostatyczne antybiotyku 9.865 RP wobec pewnej liczby drobnoustrojów zostało stwierdzone za pomocą jednej z powszechnie stosowanych w tej dziedzinie metod rozcieńczania.

Dla każdego drobnoustroju ustalono minimalne stężenie substancji, które w określonych warunkach zahamowuje wszelki widoczny rozwój na odnośnej pożywce. Wyniki różnych badań są podane w tablicy VI, na której minimalne stężenia bakteriostatyczne są wyrażone w mikrogramach substancji na cm^3 badanego środowiska.

Tablica VI

Widma przeciwbakteryjne

Badany mikroorganizm	9.865 RP	13.057 RP	13.213 RP
	Minimalne stężenie bakteriostatyczne mcg/cm^3	Minimalne stężenie bakteriostatyczne mcg/cm^3	Minimalne stężenie bakteriostatyczne mcg/cm^3
Staphylococcus aureus szczep 209 P-ATCC 6538P	0,20	4,3	0,14
" " szczep Oxford-ATCC 9144	0,26	4,2	0,15
" " szczep 133 (Instytut Pasteur'a)	0,14	4,2	0,083
" " szczep B ₃ (odporny na streptomycynę i penicylinę)	0,35	5,2	0,20
" " szczep Hb (odporny na tetracyklinę i penicylinę)	0,32	5,3	0,17
" " szczep Launoy I (odporny na tetracyklinę, streptomycynę, na chloramfenikol i na penicylinę)	0,21	7,1	0,091
" " szczep Launoy 2 (odporny na tetracyklinę, streptomycynę i na penicylinę)	0,17	4,8	0,091
" " szczep Beaujon 3 (odporny na tetracyklinę, streptomycynę, na chloramfenikol i na penicylinę)	0,16	4,4	0,068
" " szczep 2700 R — odporny na streptotryeinę	0,21	4,7	0,10
" " szczep 1142 R — odporny na kongocydynę	0,17	2,1	0,10
" " szczep 3486 R — odporny na spiramycynę	0,21	5,2	0,091
" " szczep odporny na karbomycynę	0,23	5,3	0,12
" " szczep odporny na erytromycynę	0,11	3,8	0,055
" " szczep odporny na chloramfenikol	0,08	4,1	0,045
" " szczep odporny na nowobiocynę	0,12	3,9	0,075

dalszy ciąg tablicy VI

Staphylococcus aureus	szczep odporny na streptograminę	0,16	1,9	0,076
"	"	0,19	5,8	0,10
"	"			
	szczep 662 R (odporny na rufochromomycynę)	0,29	6,3	0,16
Micrococcus citreus	— ATCC 8,411	0,71	4,2	0,19
"	lysodeikticus	0,21	2,5	0,068
Gaffkya tetrageba	(Fac. Phie)	0,44	6,7	0,23
Sarcina lutea	— ATCC 9,341	0,15	1,2	0,088
"	alba (Fac. Phie)	0,88	3,3	0,18
Streptococcus faecalis	(Entérocoque de Thiercelin, Fac. Phie)	1,2	19	0,55
Streptococcus faecalis	— ATCC 9,790	2,1	30	1
"	viridans (Instytut Pasteur'a)		43	2,1
"	pyogenes hemolyticus (szczep Dig 7, Instytut Pasteur'a)	0,11	1,6	0,17
Diplococcus pneumoniae	(szczep Til. Instytut Pasteur'a)	0,075	0,89	0,05
Neisseria catarrhalis	(Fac. Phie)	0,31	2,2	0,12
Corynebacterium pseudodiphthericum	(Fac. Phie)	0,026	1,7	0,017
Lactobacillus casei	— ATCC 7469	0,035	1,2	0,017
Bacillus subtilis	— ATCC 6633	0,12	1,2	0,058
"	"			
"	szczep ZO 5 A, Fac. Phie	0,12	1,5	0,044
"	szczep 3 R 9575, Merck — ATCC 9524	0,12	1,8	0,052
Bacillus cereus	— ATCC 6630	0,24	2,2	0,084
"	brevis — ATCC 8185	0,14	1,4	0,083
Bacillus mycoides		0,14	1,8	0,049
"	megatherium (NRRL B 1125)	0,25	1,3	0,15
"	polymyxa (NCTC 4747)	0,70	4,4	0,83
Mycobacterium smegmatis	— ATCC 607	0,13	1,2	0,21
"	phlei — Instytut bakteriologiczny w Lyonie	0,041	5	0,035
"	para-smegmatis (A 75 — Lozanna)	0,069	2,2	0,09
Escherichia coli	— ATCC 9637	4,3	500	5,1
Shigella dysenteriae	— Shiga L — Instytut Pasteur'a	16	2000	13
Salmonella typhimurium	(Instytut Pasteur'a)	31	1000	13
"	paratyphi A (Lacasse, Instytut Pasteur'a)	3,9	16	
"	schottmuelleri (paratyphi B) Fougenc Instytut Pasteur'a)	16	1000	13
Bacillus lactis aerogenes	(Fac. Phie)	1,9	120	
Aerobacter aerogenes	— ATCC 8308	7,8	1000	6,3
Alcaligenes faecalis	— ATCC 8749	0,18	1,8	0,065
Proteus vulgaris	(Fac. Phie)	16	2000	25
"	X 19	3,9	62	3,1
Klebsiella pneumoniae	— ATCC 10,031	1	8,9	0,88
Serratia marcescens	(A. 476, Lozanna)	7,8	120	6,3
Pseudomonas aeruginosa	(sche Bass — Instytut Pasteur'a)	16	1000	12
Brucella bronchiseptica	(CN 387 — Wellcome Instytut)		62	6,3
Pasteurella multocida	(A. 125 — Instytut Pasteur'a)	0,24	1,8	0,07

Te różne wyniki wykazują, że działanie bakteriostatyczne antybiotyku 9.865 RP obejmuje liczne bakterie wśród których znajdują się szczepy uodpornione na jeden lub kilka spośród następujących antybiotyków: penicylina, tetracyklina, streptomycyna, streptotrycyna, neomycyna, kongocydyna, erytromycyna, karbomycyna, spiramycyna, streptogramina, chloramphenikol, nowobiocyna oraz następujące antybiotyki przeciwrakowe: aktinomicyna i rufochromomycyna.

Działanie przeciwrakowe antybiotyku 9.865 RP zostało wykazane laboratoryjnie, przy czym antybio-

tyk ten wykazał szczególną aktywność wobec nowotworów przeszczepialnych u myszy, jak na przykład ascite Ehrlicha, sarkoma 180, sarkoma benzopirenowa oraz białaczka limfoblastyczna AKR. Toksyczność antybiotyku 13.057 RP badano głównie u myszy. Jego dawka śmiertelna 50% (lub DL₅₀) została wyznaczona w drodze zastrzyku podskórnego:

DL₅₀ — 47 mg/kg (podskórnie).

Wyznaczono również dawkę śmiertelną 50% (lub DL₅₀) (jeden zastrzyk raz dziennie w ciągu 5 dni) w drodze zastrzyków dożylnych lub podskórnych:

DL₅₀ — 8,75 mg/kg (dożylnie),
DL₅₀ — 13,65 mg/kg (podskórnio).

Organizmy wytwarzające antybiotyk 9.865 RP należą do rodzaju *Streptomyces* i zostały oznaczone nazwami *Streptomyces* 8899 i *Streptomyces* 31.723. Zostały one zdeponowane w Northern Regional Research Laboratory, Peoria, III., Stany Zjednoczone Ameryki, pod numerami: NRRL 3046 i NRRL 3045.

Mikroorganizmy te zostały wyodrębnione z gruntów pobranych w dwóch różnych rejonach Algierii. Metoda izolacji jest następująca:

Próbkę gruntu umieszcza się w postaci zawiesiny w wysterylizowanej wodzie destylowanej, potem zawiesinę tę rozcieńcza się do różnych stopni koncentracji. Drobną ilość każdego roztworu umieszcza się w naczyniach Petri'ego zawierających pożywkę agarową.

Po kilkudniowej inkubacji w temperaturze 26° przeszczepia się mikroorganizmy, które mogą być wyizolowane na podłoże z agarem umieszczonym ukośnie w celu otrzymania większej objętości hodowli.

Studiując nowoczesną literaturę klasyfikacyjną dotyczącą identyfikacji promieniowców (S. A. Waksman, „The Actinomycetes”, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961, cz. II — „Bergey's Manual of Determinative Bacteriology”, 7 wydanie, The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1957 — L. Ettlinger i inni, Archiv für Mikrobiologie 31, 326 (1958), nie spotykamy opisu gatunku, którego cechy hodowlane pokrywałyby się z cechami *Streptomyces* 8899 i 31.723.

Jednakże w opracowaniu G. F. Gause i inni „Zur Klassifizierung der Actinomycetes”, VEB Gustav Fisher Verlag, Jéna, 1958, omówiony jest gatunek *Streptomyces coeruleorubidus*, którego opis dość dokładnie przypomina właściwości niniejszych szczepów. Aczkolwiek według S. A. Waksman'a, „The Actinomycetes”, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961, cz. II, str. 323—326, opis ten nie jest szczegółowy, można jednak znaleźć podobieństwo *Streptomyces* 8899 i *Streptomyces* 31.723 z gatunkiem *Streptomyces coeruleorubidus* i zarejestrować odpowiednio pod nazwą *Streptomyces coeruleorubidus* — szczep 8899 i pod nazwą *Streptomyces coeruleorubidus* — szczep 31.723. Aby to zagadnienie dokładnie sprecyzować, podano poniżej szczegółowe cechy obu szczepów *Streptomyces* 8899 i *Streptomyces* 31.723, podając równoległe cechy *Streptomyces coeruleorubidus* w sposób opisany przez G. F. Gause i współpracowników.

Sporulacja *Streptomyces* 8899 i 31.723 jest trudna do zaobserwowania ze względu na jej złożoność. Można ją obserwować albo na podłożach „syntetycznych”, jakie na przykład opisuje Grundy, Antib. & Chemoth 1, 309 (1951), albo na podłożach złożonych, jakim jest podłoże Benetta (K. L. Jones, J. Bacteriol, 57, 142 (1949)).

Hodowle obserwowane pod mikroskopem wykazują tworzenie się nitek rozgałęzionych i łańcuchów spor, charakterystycznych dla gatunku *Streptomyces*. Nitki sporonośne, przedstawiające najwyższy stopień rozwoju posiadają postać spiral wielozwojowych o zwojach zwartych. Można

często naliczyć ponad 5 zwojów. Spory są owalne i od wielkości około 0,6—0,9 do 0,8—1,2μ.

Powiązanie nitki sporonośnej jest niekiedy jednokrętne, najczęściej jednak dwukrętne. Tę strukturę można zaobserwować pod mikroskopem jedynie wtedy, kiedy nitki układają się w spirale o jednym lub dwóch zwojach, albo ograniczają się do jednej pętli, inaczej natomiast zbytnia rozbudowa spiral maskuje ich powiązanie i przeszkadza w obserwacji struktury wewnętrznej.

Biorąc pod uwagę cechy morfologiczne, które stanowią najbardziej pełne stadium organizacyjne, można stwierdzić że typ ustroju sporonośnego *Streptomyces* 8899 i 31.723 odpowiada typowi *Biverticillus spira*, opisanemu w klasyfikacji T. G. Pridham'a Applied Microbiology, 6, 52 (1958).

Wiedząc, jak to podano poniżej, że grzybnia powietrzna dobrze rozwiniętych hodowli jest jasnoniebieska i nawiązując do powyższej klasyfikacji seryjnej, *Streptomyces* 8899 i 31.723 zalicza się do serii niebieskiej *Biverticillus spira*, w której nie figuruje żaden opisany gatunek, podczas gdy *Streptomyces coeruleorubidus* figuruje w serii niebieskiej *Spira* tejże klasyfikacji.

W tak zwanych środowiskach „syntetycznych” *Streptomyces* 8899 i 31.723 wytwarzają na ogół grzybnie vegetatywną, której barwa na początku hodowli jest najczęściej różowa lub różowo-pomarańczowa, a w miarę postępu inkubacji barwa staje się bardziej intensywna przybierając w końcu odcień żywej czerwieni. W środowiskach „organicznych” grzybnia vegetatywna jest brązowo-żółta lub brązowo-czerwona. Grzybnia powietrzna przy obu rodzajach środowiska jest na ogół dobrze rozwinięta.

Na początku swego rozwoju jest ona biała, potem zabarwia się bardzo szybko na kolor jasnoniebieski, określony niżej terminem niebiesko-turkusowym. W zależności od stopnia rozwoju lub charakteru środowiska natężenie zabarwienia może ulegać drobnym zmianom lub barwa może być lekko przyciemniona. Można zaobserwować tworzenie się pigmentów rozpuszczalnych o barwie czysto czerwonej lub czerwono-pomarańczowej o zmiennej intensywności w zależności od wieku hodowli w środowiskach „syntetycznych” oraz o przyciemnionej barwie czerwonej (brązowo-czerwona, brązowo-różowa) w środowiskach „organicznych”.

W środowisku William'a i Mc Coy'a daje się zauważyć obfite tworzenie się charakterystycznego czarnego pigmentu melaminowego.

Cechy hodowlane i właściwości biochemiczne *Streptomyces* 8899 i 31.723 zostały określone przy zastosowaniu pożywek agarowych lub płynnych, jakich się zwykle używa do identyfikacji szczepów *Streptomyces*. Wyniki obserwacji są szczegółowo podane poniżej na tablicy VII i dotyczą one hodowli przechowywanych około miesiąca w temperaturze 26°. Podano tam stan końcowy hodowli, ponieważ ewolucja zabarwienia została podana w rozdziale zatytułowanym „Cechy ogólne”. Bibliografia oraz skład środowisk są podane poniżej. Do tablicy dołączony jest opis *Streptomyces coeruleorubidus* według G. F. Gause, dostosowując w miarę możliwości środowiska hodowlane o zbliżonym składzie.

Tablica VII

Środowisko hodowlane	Streptomyces 8899	Streptomyces 31.723	Streptomyces Coeruleorubidus
Agar Czapek (z sacharozą) (ref. 1 środowisko Nr 1)	Grzybnia vegetatywna: skąpa, gładka, różowa, przechodząca w żywo czerwoną Grzybnia napowietrzna: niebiesko-turkusowa Pigment rozpuszczalny: jasnoczerwony	Grzybnia vegetatywna: skąpa, porysowana, różowo-żółtawa, przechodząca w średnio-czerwoną Grzybnia napowietrzna: niebiesko-turkusowa Pigment rozpuszczalny: średnio-czerwony	Środowisko vegetatywne Nr 1 Grzybnia vegetatywna: czerwono-poziomkowa do szaro-brązowej Grzybnia napowietrzna: niebieskawa Pigment rozpuszczalny: czerwono-poziomkowy do szaro-brązowego
Agar Czapek (z glukozą) (ref. 1—A)	Grzybnia vegetatywna: skąpa, sfaldowana, popękana, różowa, przechodząca w różowo-pomarańczową Grzybnia napowietrzna: niebiesko-turkusowa Pigment rozpuszczalny: czerwono-pomarańczowy	Grzybnia vegetatywna: skąpa, porysowana, różowo-żółtawa, przechodząca w średnio-czerwoną Grzybnia napowietrzna: niebiesko-turkusowa Pigment rozpuszczalny: średnio-czerwony	
Agar z jabłczanem wapniowym (ref. 2)	Grzybnia vegetatywna: skąpa, gładka, przechodząca w bladoróżową Grzybnia napowietrzna: niebiesko-turkusowa Pigment rozpuszczalny: bladoróżowy Uwaga: całkowite upłynnienie jabłczanu w ciągu 1 mies.	Grzybnia vegetatywna: skąpa, gładka, przechodząca w bladopłową Grzybnia napowietrzna: bardzo słabo rozwinięta, biała do niebiesko-turkusowej Pigment rozpuszczalny: różowo-płowy Uwaga: całkowite upłynnienie jabłczanu w ciągu 1 mies.	
Agar z tyroziną (ref. 3)	Grzybnia vegetatywna: skąpa, pofałdowana, brązowo-czarna Grzybnia napowietrzna: ślady, szarawo-biała Pigment rozpuszczalny: ciemnobrązowy Uwaga: nie upłynnia tyrozyny	Grzybnia vegetatywna: dość gęsta, pofałdowana, bardzo ciemnobrązowa Grzybnia napowietrzna: brak Pigment rozpuszczalny: ciemnobrązowy Uwaga: nie upłynnia tyrozyny	
Agar ze skrobią (ref. 1 środowisko Nr 10)	Grzybnia vegetatywna: gęsta, lekko pofałdowana, czerw.-żółtawa przechodząca w płowo-różową Grzybnia napowietrzna: niebiesko-turkusowa Pigment rozpuszczalny: pomarańczowo-czerw.	Grzybnia vegetatywna: gęsta, delikatna, pofałdowana, przechodząca w matowo-czerw. Grzybnia napowietrzna: niebiesko-turkusowa Pigment rozpuszczalny: pomarańczowo-czerw.	Grzybnia vegetatywna: bezbarwna lub różowa Grzybnia napowietrzna: niebieskawo-biaława Pigment rozpuszczalny: brak Nie hydrolizuje lub słabo hydrolizuje skrobią

dalszy ciąg tablicy VII

Agar glukozowy (ref. 1 środowisko Nr 7)	Grzybnia vegetatywna: delikatnie pofałdowana, żółkowana, przechodząca w jasnożółto-brązową Grzybnia napowietrzna: słabo rozwinięta, biała do turkusowo-nieb. Pigment rozpuszczalny: żółto-brązowy do jasnoróżowo-brązowego	Grzybnia vegetatywna: skąpa i bardzo delikatnie fałdowana, czerwono-żółtawa, potem różowawo-brązowa Grzybnia napowietrzna: ślady, biała Pigment rozpuszczalny: jasnożółtawo-brązowy	Środowisko organiczne Nr 2 Gause i współpracownicy Grzybnia vegetatywna: różowawo-brązowa Grzybnia napowietrzna: obfita, biaława Pigment rozpuszczalny: różowawo-brązowy
Agar asparaginowo-glicerynowy (ref. 1 środowisko Nr 3)	Grzybnia vegetatywna: skąpa, lekko pofałdowana, przechodząca od blado-pomarańczowo-różowej do pomarańczowo-różowej Grzybnia napowietrzna: turkusowo-niebieska Pigment rozpuszczalny: blady pomarańczowo-różowy	Grzybnia vegetatywna: dość gęsta i pofałdowana, jasnoróżowa, przechodząca w pomarańczowo-czerwoną Grzybnia napowietrzna: turkusowo-niebieska Pigment rozpuszczalny: blady, pomarańczowo-różowy	
Agar Benetta (ref. 4)	Grzybnia vegetatywna: dość gęsta, delikatnie pofałdowana, jasnoczerwono-brązowa, przechodząca w ciemnobrązową Grzybnia napowietrzna: turkusowo-niebieska Pigment rozpuszczalny: czerwono-brązowy	Grzybnia vegetatywna: skąpa i bardzo delikatnie pofałdowana, czerwono-krewetkowa, przechodząca w czerwono-brązową Grzybnia napowietrzna: turkusowo-niebieska Pigment rozpuszczalny: słaby, różowo-brązowy	
Agar ze skrobią i fosforanem amonowym (ref. 5)	Grzybnia vegetatywna: skąpa, gładka, przechodząca w blado-żółtawą do niebieskawej Grzybnia napowietrzna: bardzo dobrze rozwinięta, turkusowo-niebieska Pigment rozpuszczalny: brak	Grzybnia vegetatywna: skąpa, gładka, bezbarwna, przechodząca w lekko-różową Grzybnia napowietrzna: bardzo dobrze rozwinięta, turkusowo-niebieska Pigment rozpuszczalny: brak	
Agar z maltozą i tryptonem (ref. 6)	Grzybnia vegetatywna: bardzo gęsta, sfaladowana, splekana, przechodząca w czarno-brązową Grzybnia napowietrzna: bardzo dobrze rozwinięta, turkusowo-niebieska do szaroniebieskiej Pigment rozpuszczalny: pigment melaninowy, intensywny brązowo-czarny, charakterystyczny	Grzybnia vegetatywna: gęsta, sfaladowana, splekana, przechodząca w czarno-brązową Grzybnia napowietrzna: bardzo dobrze rozwinięta turkusowo-niebieska do szaroniebieskiej Pigment rozpuszczalny: pigment melaninowy, intensywny, brązowo-czarny, charakterystyczny	
Żelatyna (ref. 7)	Grzybnia vegetatywna: skąpa pokrywa, przechodząca w żółtawą Grzybnia napowietrzna: słabo rozwinięta, pozostaje biała Pigment rozpuszczalny: średniobrązowy Uwaga: opóźnione i niepełne upłynnienie żelatyny	Grzybnia vegetatywna: fragmentaryczna pokrywa przechodząca w żółtawo-różową Grzybnia napowietrzna: słabo rozwinięta, biała Pigment rozpuszczalny: żółto-brązowy, niezbyt obfity Uwaga: opóźnione i niepełne upłynnienie żelatyny	Grzybnia vegetatywna: ciemnożółta lub szaro-brązowa Pigment rozpuszczalny: szaro-brązowy Uwaga: opóźnione i niepełne upłynnienie żelatyny

dalszy ciąg tablicy VII

Ziemniak (ref. 1 środo-wisko Nr 27)	Grzybnia wegetatywna: gęsta, delikatnie sfałdowana, jasna brązowo-żółta, potem różowawo-brązowa Grzybnia napowietrzna: turkusowo-niebieska Pigment rozpuszczalny: ciemny, czerwono-brązowy	Grzybnia wegetatywna: gęsta i sfałdowana, pomarań- czowo-czerwona do czerwona- wo-brązowej Grzybnia napowietrzna: turkusowo-niebieska Pigment rozpuszczalny: ciemny, czerwono-brązowy	Grzybnia wegetatywna: błyszcząca bezbarwna, żółta- wa lub ciemnoróżowa Grzybnia napowietrzna: biało-niebieska, niebieska lub zielono-niebieska, niektóre szczepy różowo-niebieskie Pigment rozpuszczalny: niekiedy ciemnoróżowy
Mleko odcią- gane (ref. 8)	Grzybnia wegetatywna: obraczka gęsta, ciemna, żółta- wo-brązowa Grzybnia napowietrzna: ślady, biała Pigment rozpuszczalny: brązowy Uwagi: nie ma koagulacji ani peptonizacji, rozwój pH bardzo słaby od 6,3—6,5 do 6,0—6,3	Grzybnia wegetatywna: skąpa obrączka, różowo-żółta- wa do różowawo-brązowej Grzybnia napowietrzna: ślady, biała Pigment rozpuszczalny: brązowy Uwagi: nie ma koagulacji ani peptonizacji, rozwój pH bardzo słaby od 6,3—6,5 do 6,0—6,3	Grzybnia wegetatywna: bezbarwna lub żółtawa Pigment rozpuszczalny: brązowo-szary Uwagi: koagulacja i peptoni- zacja występują w zależności od szczepu
Roztwór skrobi (ref. 1- środo-wisko Nr 19)	Grzybnia wegetatywna: skąpa pokrywa, żywo czer- wona Grzybnia napowietrzna: słabo rozwinięta, biała do tur- kusowo-niebieskiej Pigment rozpuszczalny: pomarańczowo-czerwony Uwagi: całkowita hydroliza skrobi w ciągu mie- siąca	Grzybnia wegetatywna: skąpa pokrywa, żywo czerwo- na Grzybnia napowietrzna: ślady, biała Pigment rozpuszczalny: pomarańczowo-czerwony Uwagi: całkowita hydroliza skrobi w ciągu mie- siąca	
„Syntetyczny” roztwór azota- nowy (ref. 7)	Grzybnia wegetatywna: słabo rozwinięta, skąpa po- krywa, bezbarwna Grzybnia napowietrzna: brak Pigment rozpuszczalny: brak Uwaga: nie redukuje azoty- nów	Grzybnia wegetatywna: kilka izolowanych kolonii, żół- tawe Grzybnia napowietrzna: brak Pigment rozpuszczalny: brak Uwaga: nie redukuje azoty- nów	Grzybnia wegetatywna: bezbarwna Pigment rozpuszczalny: niekiedy żółty Uwaga: redukcja występuje lub nie — w zależ- ności od szczepu
Morfologia mikroskopowa (środo-wisko: ref. 4 i 5)	Włókna sporonośne w postaci spirali ułożonych zgodnie ze strukturą skrętów wewnętrz- nych. Spory owalne, krótkie	Jak Streptomyces 8899	Spirale o 5—7 zwojach Spory kuliste

Odnosiłki literaturowe i skład podłoża

(1) S. A. Waksman „The Actinomycetes”, Chronica Botanica Company, Waltham (Mass.) U.S.A., 1950, str. 193—197.

(1—A) Dane uzyskane po zastąpieniu sacharozy tą samą ilością wagową glukozy w poprzedniej recepturze.

(2) Jabłczan wapniowy 1%, chlorek amoniowy 0,05%, fosforan dwupotasowy 0,05%, agar 2%.

(3) Pepton 0,5%, wyciąg mięsny 0,3%, tyrozyna 0,5%, agar 2%.

(4) K. L. Jones, J. Bacteriology 57, 142 (1949).

(5) Grundy i inni Antib. and Chemoth 1, 309 (1951).

(6) A. M. Williams Mc Coy, Appl. Microbiol. 1, 307 (1953).

(7) Manual of Methods for pure culture study of bacteria, Society of American Bacteriologists (II 50—18).

(8) Odciągane mleko w proszku, rekonstruowane według wskazówek producenta.

Wykorzystanie różnych węglowodanów badano według metody T. G. Pridham'a i D. Gottlieb'a, J. Bact. 58, 467 (1946).

Hodowla odbywa się na podłożu z agarem skośnym, inkubacja zaś dokonuje się w temperaturze 26°. Do węglowodanów wywołujących regularnie szybki i całkowity wzrost szczepów, należą: ksyliza, arabinoza, ramnoza, glukoza, galaktoza, mannoza, laktoza, maltoza, rafinoza, dekstryna, amidon, gliceryna (tylko dla szczepu S. 8899), adonit, manit, sorbit, inozyt (tylko dla szczepu S. 8899). Natomiast sorboza, inulina (tylko dla szczepu S. 31.723), eskulina, erytryt i dulcyt nie pozwalają na rozwój, względnie wywołują rozwój bardzo ograniczony.

Wreszcie do substancji wywołujących wzrost nieregularnie, zależnie od próbki, względnie średnio lub słabo, należą: riboza, lewuloza, sacharoza, inulina (tylko dla S. 8899), gliceryna (tylko dla S. 31.723), inozyt (tylko dla S. 31.723).

Cechy, które należy wziąć pod uwagę dla systematyzacji szczepów 8899 i 31.723 *Streptomyces coeruleorubidus* są następujące: niebiesko-turkusowa barwa grzybni powietrznej, dwuskrętna struktura spiral układu sporonośnego, dodatnia reakcja melaminowa hodowli na odpowiednich podłożach, charakterystyczny czerwony kolor grzybni głównej na odpowiednich podłożach, charakterystyczny czerwony kolor rozpuszczalnych pigmentów na odpowiednich podłożach.

Dwie pierwsze cechy klasyfikują szczepy 8899 i 31.723 *S. coeruleorubidus* w grupie *Biverticillus spira*, seria niebieska klasyfikacji Pridham'a, gdzie nie figuruje żaden opisany gatunek.

Zespół cech klasyfikuje szczepy 8899 i 31.723 *Streptomyces coeruleorubidus* według nowej klasyfikacji S. A. Waksmana „*The Actinomyces*” (The Williams & Wilkins Cy, Baltimore, 1961) cz. II, str. 155, do grupy melaminowej +, seria 5 (wzrost barwy czerwonej przechodzącej w czerwono-pomarańczowy). W tej serii nie figuruje żaden gatunek o niebieskiej grzybni powietrznej. Szczepy 8899 i 31.723 *S. coeruleorubidus* mogą figurować w tej serii z oznaczeniem: „grzybnia powietrzna niebieska”.

Sposób wytwarzania antybiotyku 13.057 RP według wynalazku polega na hodowli szczepu *Streptomyces coeruleorubidus* (NRRL 3045 lub NRRL 3046) w ciągu 2—5 dni w ciekłym, aerobowym środowisku odżywczym, przy wartości pH 6—8 i w temperaturze 20—35°C, zawierającym źródła węgla i azotu, takie jak węglowodany, tłuszcze, aminokwasy, sole amonowe, azotany i naturalne produkty kompleksowe zawierające te substancje i zawierającym jednocześnie sole mineralne takie jak chlorki, siarczany, fosforany i węglany metali alkalicznych i metali ziem alkalicznych.

Hodowlę *Streptomyces 8899* lub *Streptomyces 31.723* można prowadzić dowolną powietrzną metodą hodowli powierzchniowej lub głębinowej, przy czym ta ostatnia jest dogodniejsza. Stosuje się do tego celu różną aparaturę, będącą obecnie w powszechnym użyciu w przemyśle fermentacyjnym.

W szczególności można przyjąć następujący cykl kolejnych procesów: kultura *Streptomyces 8899* (lub *Streptomyces 31.723*), hodowla agarowa, hodowla na trzęsawce, hodowla inoculum w zbiorniku fermentacyjnym, hodowla antybiotyku w zbiorniku fermentacyjnym.

Środowisko fermentacyjne powinno zasadniczo zawierać źródło węgla oraz źródło przyswajalnego azotu, składniki mineralne i ewentualnie czynniki regulujące wzrost, przy czym wszystkie te składniki można wprowadzić bądź w postaci określonych substancji, bądź też w postaci złożonych mieszanin, jakie występują w biologicznych substancjach różnego pochodzenia.

Jako źródło przyswajalnego węgla można stosować węglowodany takie jak glukoza, sacharoza, laktoza, dekstryny, skrobia, melasy lub inne substancje węglowodorowe, jak alkohole-cukry i manitol lub jak niektóre kwasy organiczne na przykład kwas mlekowy, cytrynowy, winowy. Niektóre oleje pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego, jak na przykład olej smalcowy lub sojowy, mogą z pożytkiem zastąpić te różne źródła węglowodorowe albo stanowić dodatek do nich.

Odpowiednie źródła przyswajalnego azotu są bardzo różnorodne. Mogą to być bardzo proste substancje chemiczne jak azotany, nieorganiczne i organiczne sole amonowe, mocznik, aminokwasy. Można je również wprowadzać za pomocą substancji złożonych, zawierających głównie azot w postaci proteidów, a mianowicie: kazeiny, laktoalbuminy, glutenu oraz produktów ich hydrolizy, mąki sojowej, mąki z orzeszków ziemnych, mączki rybnej, ekstraktów mięsnych, drożdży, rozpuszczalnych destylatów, namoku kukurydzowego.

Niektóre spośród dodawanych składników nieorganicznych mogą działać jako substancje buforowe lub neutralizujące, jak na przykład fosforany metali alkalicznych lub metali ziem alkalicznych albo węglany wapnia i magnezu.

Inne wprowadzają równowagę jonową konieczną dla rozwoju *Streptomyces 8899* i *31.723* i do wytworzenia antybiotyku, jak na przykład chlorki i siarczany metali alkalicznych i metali ziem alkalicznych. Inne wreszcie działają szczególnie jako aktywatory reakcji przemiany materii szczepów *Streptomyces 8899* i *31.723*, są to sole cynku, kobaltu, żelaza, miedzi i manganu.

Wartość pH środowiska fermentacyjnego przy rozpoczęciu hodowli winna wynosić między 6,0 i 7,8, najlepiej 6,5 a 7,5. Optymalną temperaturą dla fermentacji jest 25—28°C, zadowalające jednak wyniki produkcyjne otrzymuje się już w temperaturach między 23° a 35°C. Napowietrzanie środowiska fermentacyjnego może się wahać w dość szerokich granicach. Stwierdzono jednak, że szczególnie korzystne jest doprowadzenie od 0,3 do 2 litrów powietrza na litr bulionu i na 1 minutę. Maksymalną wydajność antybiotyku uzyskuje się po 2—5 dniach hodowli, czas ten zależy jednak głównie od zastosowanego środowiska.

Z powyższego wynika, że ogólne warunki hodowli *Streptomyces 8899* i *Streptomyces 31.723* dla produkcji antybiotyku 13.057 RP mogą zmieniać

się w dość znacznym stopniu i można je dostosować do każdej potrzeby.

Antybiotyk 13.057 RP można wyodrębnić z brzcзки fermentacyjnej różnymi sposobami.

Brzczkę filtruje się przy wartości pH między 1,5 a 9 i w tych warunkach znaczna część aktywnej substancji przechodzi do przesączu. Po przemyciu wodą płacek filtracyjny praktycznie nie zawiera już substancji czynnej. Korzystnie jest czynność tę wykonać w środowisku kwaśnym, a zwłaszcza przez zakwaszenie do wartości pH między 1,5 i 2 przy pomocy kwasu szczawowego. Można również filtrować przy wartości pH między 2 a 7, najlepiej jednak w pobliżu 2, w obecności alkoholu alifatycznego zawierającego 1 do 3 atomów węgla.

W wyniku powyższych czynności ekstrakcyjnych otrzymuje się antybiotyk 9.865 RP w roztworze wodnym lub wodnoalkoholowym, a następnie przeprowadza się go w roztwór organiczny przez ekstrakcję przy pomocy rozpuszczalnika organicznego, nie mieszającego się z wodą, jak butanol, metyloizobutyloketon, octan etylowy lub chloroform, przy wartości pH między 5,5—9, najlepiej w pobliżu 7,5. Tę ekstrakcję może ewentualnie poprzedzić zastosowanie wymiennicza jonowego.

W tym przypadku roztwór wodny doprowadza się do wartości pH około 4, która następnie ustala się na żywicy karboksylowej, stanowiącej wymienniczkę kationów, najlepiej Amberlit IRC 50. Kolumnę przemywa się następnie roztworem wodnoalkoholowym zawierającym kwas lub sól, najlepiej metanolem zawierającym 10% wody i 1% chloru sodu. Eluat zagęszcza się następnie w celu usunięcia alkoholu, a potem ekstrahuje, jak opisano powyżej.

Brzczkę fermentacyjną można również poddać procesowi ekstrakcji przy pomocy organicznego rozpuszczalnika nie mieszającego się z wodą, jak butanol, octan etylowy lub chloroform, przy wartości pH między 5,5 a 9, najlepiej około 7,5. W tym przypadku cała aktywna substancja przechodzi do fazy organicznej, którą się oddziela od fazy wodnej klasycznymi metodami.

Bez względu na wybór sposobu ekstrakcji otrzymuje się ostatecznie antybiotyk 9.865 RP w roztworze organicznym. W tym stadium może okazać się korzystnym oczyszczanie produktu przez sukcesywne przeprowadzenie antybiotyku w roztwór wodny, a następnie w roztwór organiczny przez zmianę wartości pH.

Surowy antybiotyk 13.057 RP (łącznie z antybiotykiem 13.213 RP) można następnie wyizolować z roztworu organicznego uzyskanego ostatecznie przez zagęszczanie lub wytrącanie przy pomocy rozpuszczalnika w którym antybiotyk źle się rozpuszcza, takiego jak heksan. Szczególnie korzystną metodą izolacji jest zakwaszenie roztworu organicznego do wartości pH około 4, najlepiej przy pomocy kwasu octowego, a następnie zagęszczenie go pod obniżonym ciśnieniem do małej objętości. Dodanie rozpuszczalnika w którym antybiotyk 13.057 RP źle się rozpuszcza, jakim jest heksan, do uzyskanego koncentratu powoduje wytrącenie surowego antybiotyku.

Dla otrzymania czystego antybiotyku 9.865 RP można stosować powszechnie znane metody klasyczne, jak chromatografię na rozmaitych adsor-

bentach, rozdzielanie w przeciwwądzie, lub podział między różne rozpuszczalniki. Szczególnie korzystne okazało się stosowanie jednej z dwóch następujących metod: chromatografia surowego antybiotyku rozpuszczonego w butanolu na kolumnie z tlenkiem glinowym o wartości pH = 4, lub rozpuszczenie surowego antybiotyku w mieszaninie chlorek metylenowy — czterochlorek węgla — woda (w stosunku objętościowym 5:1:6), odcedzenie fazy wodnej, następnie ekstrahowanie jej chlorkiem metylenowym, połączenie produktów ekstrakcji chlorkiem metylenowym, potem zagęszczenie ich pod zmniejszonym ciśnieniem i wreszcie dodanie heksanu do uzyskanego koncentratu, a celu wytrącenia oczyszczonego antybiotyku. Można również stosować podobną metodę, zastępując chlorek metylenowy octanem etylowym.

Jest rzeczą zrozumiałą, że te różne metody ekstrakcji i izolacji antybiotyku 9.865 RP można powtarzać kilkakrotnie zależnie od wymagań produkcyjnych dla uzyskania tego antybiotyku w postaci odpowiedniej dla przewidywanego stosowania.

Wyizolowany w ten sposób antybiotyk 9.865 RP można następnie rozdzielić na antybiotyki 13.057 RP i 13.213 RP. Tę separację można przeprowadzić klasycznymi metodami stosowanymi dla rozdzielania antybiotyku na jego części składowe, jak na przykład chromatografia na różnych adsorbentach albo rozdział w przeciwwądzie. Stwierdzono, że ta ostatnia daje najlepsze rezultaty, zwłaszcza jeżeli stosuje się jeden z następujących procesów, wymienionych jedynie jako korzystne przykłady.

W celu otrzymania antybiotyku 13.057 RP stosuje się rozdział w przeciwwądzie antybiotyku 9.865 RP w układzie butanol — fosforanowa mieszanina buforowa o wartości pH = 7 — 7,5. Dla otrzymania samego antybiotyku 13.213 RP prowadzi się rozdział w przeciwwądzie antybiotyku 9.865 RP w układzie butanol — octan etylowy — mieszanina buforowa o wartości pH = 4. Dla otrzymania z antybiotyku 9.865 RP jego składników oddzielnie przeprowadza się dwa sukcesywne rozdziały w przeciwwądzie: najpierw przy pomocy ograniczonej ilości przepływów w układzie złożonym z dwóch węglowodorów alifatycznych zawierających chlor i mieszaniny buforowej o wartości pH = 5,8, co pozwala na otrzymanie dwóch frakcji: z jednej strony w fazie wodnej antybiotyk 13.057 RP zanieczyszczony antybiotykiem 13.213 RP, a z drugiej strony w fazie organicznej antybiotyk 13.213 RP z zanieczyszczeniem 13.057 RP, następnie oddzielne potraktowanie obu w ten sposób otrzymanych frakcji systemem: octan etylowy — metanol — fosforowa mieszanina buforowa o wartości pH = 5,5, co pozwala na otrzymanie z jednej strony 13.057 RP, a z drugiej oddzielenie 13.213 RP.

Przed tymi różnymi operacjami rozdzielania w przeciwwądzie albo po nich mogą oczywiście nastąpić różne klasyczne operacje oczyszczające, a mianowicie ekstrakcja i rekrytalizacja, w celu otrzymania trzech poszukiwanych składników w postaci odpowiadającej przewidywanemu zastosowaniu.

Następujące przykłady nie ograniczając wynalazku, wykazują w jaki sposób można go stosować

w praktyce. W przykładach tych określono wszędzie aktywność metodą turbidymetrii, stosując *Klebsiella pneumoniae* jako czuły zarodek i porównując z próbką 9.865 RP o znanej aktywności w charakterze wzorca. Aktywność ta jest wyrażona w jednostkach (μ) na mg w przypadku produktu stałego i w jednostkach na cm^3 w przypadku roztworu (jednostka stanowi najmniejszą ilość produktu, który po rozpuszczeniu w 1 cm^3 odpowiedniego środowiska, wstrzymuje wzrost *Klebsiella pneumoniae* w określonych warunkach). Temperatury w przykładach podano w stopniach Celsjusza.

Przykład I. Do zbiornika fermentacyjnego o pojemności 170 litrów ładuje się: namok kukurydziany 2,400 kg, sacharoza 3,600 kg, węglan wapniowy 0,900 kg, siarczan amoniowy 0,240 kg, woda dopełniona do 100 litrów.

Środowisko to posiada wartość pH = 6,15. Sterylizuje się je w ciągu 40 minut przez wprowadzenie pary o temperaturze 122° za pomocą bełkotki. Po oziębieniu objętość bulionu wynosi 120 litrów, a wartość pH = 7,20. Następnie obsiewa się środowisko przy pomocy 200 cm^3 hodowli szczepu *Streptomyces* 31.723 wstrząsanej w kolbie Erlenmayer'a. Hodowla odbywa się w temperaturze 26—27° w ciągu 27 godzin przy wstrząsaniu i napowietrzaniu wyjałowionym powietrzem i wówczas nadaje się do obsiewu hodowli produkcyjnej.

Hodowla produkcyjna odbywa się w zbiorniku fermentacyjnym o pojemności 800 litrów, załadowanym następującymi substancjami: mąka sojowa 20 kg, „Distillers'solubles” 2,500 kg, skrobia 10 kg, olej sojowy 2,500 litra, chlorek sodowy 5 kg, woda dopełniona do 465 litrów.

Otrzymane w ten sposób pH środowiska doprowadza się do wartości = 7,20 za pomocą 400 cm^3 10 n roztworu węglanu sodowego. Następnie sterylizuje się je w ciągu 40 minut przez doprowadzenie pary o temperaturze 122° za pomocą bełkotki. Po oziębieniu objętość bulionu wynosi 500 litrów, a wartość pH = 6,75. Wtedy się go obsiewa 50 litrami poprzedniej hodowli ze zbiornika 170 litrowego. Hodowla odbywa się w temperaturze 28° w ciągu 67 godzin przy wstrząsaniu i napowietrzaniu wyjałowionym powietrzem. Wartość pH środowiska wynosi wtedy 7,40, a objętość brzeczki 520 litrów. Ilość antybiotyku 9.865 RP w tym środowisku wynosi 29 j/cm^3 .

Przykład II. Hodowla inoculum odbywa się w zbiorniku 170-litrowym w tych samych warunkach, jak w przykładzie I, lecz posiewu dokonuje się 200 cm^3 hodowli szczepu *Streptomyces* 8899, znajdującej się we wstrząsanej kolbie Erlenmayer'a.

Hodowla produkcyjna odbywa się następnie w zbiorniku 800-litrowym, załadowanym jak w przykładzie I. Wartość pH środowiska doprowadza się wtedy do 8,10 za pomocą 750 cm^3 10 n roztworu węglanu sodowego. Następnie sterylizuje się je w ciągu 40 minut doprowadzając przy pomocy bełkotki parę o temperaturze 122°. Po ochłodzeniu objętość bulionu wynosi 500 litrów, a wartość pH = 6,80. Wtedy następuje posiew 75 litrami poprzedniej kultury ze zbiornika 170-litrowego. Hodowla odbywa się w temperaturze 26—27° w cią-

gu 67 godzin przy wstrząsaniu i napowietrzaniu wyjałowionym powietrzem. Wartość pH ośrodka wynosi potem 7,40, a objętość brzeczki 545 litrów. Ilość antybiotyku 9.865 RP w tym środowisku wynosi 9,1 j/cm^3 .

Przykład III. Brzeczkę otrzymaną w przykładzie I (520 litrów o zawartości 29 j/cm^3 antybiotyku 9.865 RP) wprowadza się do zbiornika zaopatrzonych w mieszadło i doprowadza się wartość pH do 1,8 za pomocą stężonego roztworu kwasu szczawiowego. Brzeczkę miesza się w ciągu godziny, potem dodaje się 20 kg pomocniczego środka filtracyjnego, takiego jak ziemia okrzemkowa. Mieszanie przesącza się przez prasę filtracyjną, a placek filtracyjny przemycza się 100 litrami wody zakwaszonej kwasem szczawiowym do wartości pH = 2. Do przesącza, którego objętość wynosi 612 litrów, dodaje się 10 n roztworu węglanu sodowego aż pH osiągnie wartość 4,5. Następnie przepuszcza się przesącz przez kolumnę zawierającą 20 litrów Amberlitu IRC 50 w cyklu kwasowym (średnica kolumny = 15,2 cm, wysokość = 200 cm, wysokość wymiennicza w kolumnie wynosi w stanie spoczynku 110 cm).

Filtrat przechodzi warstwę Amberlitu od dołu do góry z szybkością 40 litrów na godzinę. Następnie przemycza się kolumnę najpierw 100 litrami wody przepływającej z dołu do góry z szybkością 50 litrów/godzinę, a potem 75 litrami 10% roztworu wodnego metanolu przepływającego z góry w dół z szybkością 50 litrów/godzinę w ciągu 1,5 godziny. Przesącz odrzuca się, a kolumnę eluuje roztworem o składzie następującym: chlorek sodowy 10 g, woda 100 cm^3 , metanol uzupełniony do 1.000 cm^3 .

Eluat zawierający większą część antybiotyku 9.865 RP ma objętość 100 litrów. Zagęszcza się go pod zmniejszonym ciśnieniem przy temperaturze 35° do objętości 10 litrów.

Następnie przy wartości pH = 7,5 ekstrahuje się koncentrat sukcesywnie dwa razy 5 litrami chloroformu. Ekstrakt chloroformowy doprowadza się do wartości pH = 4 za pomocą roztworu kwasu octowego w chloroformie (w stosunku objętościowym 10 : 100), potem zagęszcza w temperaturze 30° pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 100 cm^3 . Następnie antybiotyk 9.865 RP strąca się 1 litrem heksanu, odwirowuje, przemycza i suszy. W ten sposób otrzymuje się 9 g bezpostaciowego proszku czerwonego o aktywności 1.400 μg .

Przykład IV. 17,1 g nieoczyszczonego produktu otrzymanego według przykładu III (aktywność 1530 μg) rozpuszcza się, wstrząsając, w mieszaninie zawierającej 1,5 litra chlorku metylenowego, 0,3 litra czterochlorku węgla i 1,8 litra wody. Wartość pH doprowadza się następnie do 3 przez dodanie 8 cm^3 normalnego kwasu solnego. Po dekantacji dodaje się do fazy wodnej 7 litrów chlorku metylenowego i 200 cm^3 0,1 n roztworu sodu, aby doprowadzić wartość pH do 7,5. Znowu następuje dekantacja i ekstrakcja fazy wodnej o wartości pH = 7,5 za pomocą 3,5 litra chlorku metylenowego.

Produkty ekstrakcji chlorkiem metylenowym łączy się i zagęszcza do objętości 100 cm^3 . Po dodaniu do koncentratu 1 litra heksanu strąca się

produkt, który zostaje poddany filtracji, przemyciu i wysuszeniu w temperaturze 30° pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymujemy w ten sposób 9,15 g antybiotyku 9.865 RP w postaci czerwono-pomarańczowego proszku bezpostaciowego o aktywności 2.180 μ/mg.

Przykład V. Przygotowuje się mieszaninę: chlorek metylenowy — czterochlorek węgla — mieszanina buforowa Mac Ilvaine'a o wartości pH = 5,8 (20 cm³ tej mieszaniny buforowej sporządza się z 12,09 cm³ Na₂HPO₄ 0,2 M oraz 7,91 cm³ kwasu cytrynowego 0,1 M) w stosunku objętościowym 2:1,3, kiedy mieszanina jest w równowadze, rozdziela się obie fazy. Rozpuszcza się 10 g antybiotyku 9.865 RP o aktywności 1750 j/mg (uzyskanego według przykładu IV) w mieszaninie zawierającej po 1 litrze każdej fazy. Ten układ poddaje się rozdzielaniu w przeciwnym kierunku o 6 przepływach w balonach 5-litrowych, wykorzystując fazę ciężką (rozpuszczalnik) jako fazę ruchomą, a fazę lekką (wodną) jako fazę stacjonarną i stosując każdorazowo po 1 litrze każdej fazy. Zbiera się oddzielnie mieszaninę faz dolnych (mieszanina A) i górnych (mieszanina B) z czterech pierwszych balonów oraz mieszaninę faz dolnych (mieszanina C) i górnych (mieszanina D) z trzech ostatnich balonów.

Mieszaninę B doprowadza się do wartości pH = 7,5 przez dodanie 300 cm³ 1 n roztworu sody, później ekstrahuje się sukcesywnie za pomocą 4 litrów, 2 litrów i 1 litra chloroformu. Ekstrakty chloroformowe i mieszaninę A łączy się i zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem do 700 cm³. Koncentrat przemycia się 2 porcjami po 350 cm³ wody o wartości pH = 7,5 a roztwory — matki z przemycania ekstrahuje się 2 porcjami po 100 cm³ chloroformu. Przemity koncentrat i ekstrakty chloroformowe łączy się i zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 70 cm³. Wtedy dodaje się 700 cm³ heksanu i otrzymany osad filtruje się, przemycia i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem przy 30°, w ten sposób otrzymuje się 5,1 g frakcji F₁ zawierającej głównie antybiotyk 13.057 RP.

Z drugiej strony ekstrahuje się mieszaninę D sukcesywnie 3 litrami, potem 1,5 litra chlorku metylenowego. Ekstrakty chlorku metylenowego i mieszaninę C łączy się i zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem do 800 cm³. Koncentrat przemycia się 400 cm³ wody, później znów zagęszcza do 700 cm³. Potem dodaje się 1 litr heksanu i otrzymany osad filtruje się, przemycia i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem przy 30°, w ten sposób otrzymuje się 3,7 g frakcji F₂ zawierającej głównie składnik 13.213 RP.

Przykład VI. 10 g produktu podobnego do wyżej wymienionej frakcji F₁ poddaje się — po rozpuszczeniu w 200 cm³ mieszaniny: octan etylowy — metanol — bufor fosforowy M/15 o wartości pH = 5,5 w stosunku objętościowym 8:3:5 — rozdzielaniu w przeciwnym kierunku o 110 przepływach w aparacie Craig'a liczącym 50 komór (50 przepływów w aparacie i 60 przepływów według techniki „single withdrawal”) rozpoczynając od dwóch pierwszych komór. Mieszaninę faz górnych z komór od 0—37 (3,8 litra) zbiera się i zagęszcza do 300 cm³.

Otrzymany w ten sposób koncentrat oraz mieszaninę faz dolnych z komór od 0—37 (3,8 litra) znów się łączy i zagęszcza do 800 cm³. Wtedy doprowadza się wartość pH do 8 przez dodanie 180 cm³ 1 n roztworu sody, a otrzymany roztwór ekstrahuje się sukcesywnie 800 cm³, potem 400 cm³ chloroformu.

Ekstrakty chloroformowe zagęszcza się do 400 cm³ i przemycia 400 cm³ wody zalkalizowanej do wartości pH=8, przy czym roztwory — matki z przemycania ekstrahuje się 200 cm³ chloroformu. Przemity koncentrat i ekstrakty chloroformowe łączy się, zagęszcza do 400 cm³, przemycia 400 cm³ zalkalizowanej wody o wartości pH = 8, zagęszcza do 100 cm³, dodaje 200 cm³ butanolu i znów zagęszcza do 100 cm³,

Otrzymany w ten sposób roztwór butanolowy doprowadza się do wartości pH = 3,5 przez dodanie 30 cm³ butanolu nasyconego 1 n kwasem solnym i oziębia przez 12 godzin w temperaturze 4°. Powstają kryształy, które filtruje się, przemycia i suszy. W ten sposób otrzymuje się pierwszą porcję 4,55 g nieoczyszczonego chlorowodoru 13.057 RP. Przez zagęszczenie roztworów — matek krystalizacji do 100 cm³, dodanie 1 litra heksanu, potem filtrację, przemycie i osuszenie otrzymany osad otrzymuje się drugą porcję 2,5 g nieoczyszczonego chlorowodoru 13.057 RP.

Przykład VII. 3,75 g chlorowodoru 13.057 RP w stanie nieoczyszczonym otrzymanego w sposób podany w przykładzie VI, rozpuszcza się w 40 cm³ dioksanu, zawierającego 20% wody. Uzyskany roztwór filtruje się i dodaje do niego najpierw 15 cm³ bezwodnego dioksanu w ciągu 2 godzin, potem 235 cm³ bezwodnego dioksanu w ciągu 30 minut. Wykryształizowuje się produkt, który się odwirowuje, przemycia i suszy, otrzymując w ten sposób 2,75 g chlorowodoru 13.057 RP w postaci czerwono-pomarańczowych igiełek, topniejących w temperaturze 225—230° przy jednoczesnym rozpadzie i o mocy 151 μ/mg.

0,208 g tego produktu rozpuszcza się w mieszaninie 200 cm³ wody i 150 cm³ butanolu. Do tego dodaje się 3,4 cm³ 0,1 n roztworu sody, dekantuje się i wreszcie ekstrahuje fazę wodną za pomocą 50 cm³ butanolu. Ekstrakty butanolowe łączy się, przemycia 2 razy 100 cm³ wody zalkalizowanej do wartości pH = 8 i zagęszcza do 10 cm³. Uzyskany koncentrat poddaje się działaniu 50 cm³ heksanu i otrzymany osad filtruje się, przemycia i suszy, w ten sposób otrzymuje się 0,0945 g antybiotyku 13.057 RP w postaci bezpostaciowego proszku czerwonego o mocy 160 μ/mg.

Przykład VIII. 5 g produktu podobnego do frakcji F₂, otrzymanej według przykładu V, po rozpuszczeniu w 200 cm³ mieszaniny zawierającej octan etylowy — metanol — bufor fosforowy M/15 o wartości pH = 5,5 w stosunku objętościowym 8:3:5, poddaje się rozdzielaniu identycznemu do opisanego w przykładzie VI. Zbiera się mieszaninę faz wyższych z komór 36—89 (5,3 litra) i zagęszcza się ją do 500 cm³. Otrzymany koncentrat i mieszaninę faz dolnych z komór 36—89 (5,3 litra) łączy się i zagęszcza do 800 cm³. Potem ekstrahuje się koncentrat sukcesywnie dwiema por-

cyjami po 800 cm³ chlorku metylenowego, później 800 cm³ chloroformu.

Otrzymane ekstrakty łączy się, zagęszcza do 400 cm³, przemywa 2 razy 400 cm³ wody o wartości pH = 7,5 i wreszcie zagęszcza się do 10 cm³. Przez dodanie 100 cm³ heksanu strąca się produkt, który podlega filtracji, przemyciu i wysuszeniu pod zmniejszonym ciśnieniem, w ten sposób otrzymuje się 1,1 g antybiotyku 13.213 RP jako bezpostaciowy proszek czerwono-pomarańczowy o mocy 2650 μ/mg.

Przykład IX. 500 litrów brzeczki fermentacyjnej, otrzymanej jak w przykładzie II, poddaje się obróbce jak w przykładzie III. Otrzymuje się w ten sposób 8,5 g nieoczyszczonego antybiotyku 9.865 RP o mocy 395 j/mg.

17 g produktu, podobnego do otrzymanego wyżej oczyszcza się według opisu podanego w przykładzie IV, lecz zamiast chlorku metylenowego stosuje się octan etylowy. W ten sposób otrzymuje się 3 g antybiotyku 9.865 RP o mocy 1300 j/mg.

Przykład X. 12,4 g antybiotyku 9.865 RP otrzymanego jak w przykładzie IX poddaje się w mieszaninie butanol-bufor fosforowy M/3 o wartości pH = 7,3 (roztwór buforowy zawierający fosforany metali alkalicznych np. PO₄Na₂H⁺ + PO₄NaH₂ w roztworze wodnym M/3, to jest 1/3 PO₄ w litrze) procesowi rozdzielania w przeciwnym kierunku o 50 przepływach.

W wyniku ekstrakcji butanolowej dolnych faz z komór 12—35, zagęszczenia ekstraktów butanowych, przemycia i dodania heksanu otrzymuje się pierwszą porcję w ilości 1 g chlorowodoru 13.057 RP, a później po zagęszczeniu roztworów — matek, drugą porcję 1,1 g chlorowodoru 13.057 RP. Te dwa osady, po rekrystalizacji w wodnym roztworze dioksanu występują w postaci czerwono-pomarańczowych igiełek o temperaturze topnienia 225—230° przy jednoczesnym rozpadzie i o mocy 67 j/mg.

Podobna procedura zastosowana do komór 36—49 daje w wyniku 1,1 g surowego antybiotyku 13.213 RP o mocy 1800 j/mg, który po poddaniu procesowi rozdzielania w przeciwnym kierunku o 50 przepływach w układzie: butanol — octan etylowy — bufor Mac Ilvaine'a o pH 4 w stosunku objętościowym 3:7:10 pozwala na otrzymanie 0,5 g produktu 13.213 RP, w postaci czerwono-pomarańczowego proszku bezpostaciowego o mocy 2000 j/mg.

Przykład XI. 625 litrów brzeczki przygotowanej według opisu podanego w przykładzie II wprowadza się do wstrząsanego zbiornika. Wartość pH doprowadza się do 9 za pomocą 10 n roztworu węgla sodowego. Wstrząsanie trwa 30 minut, potem dodaje się 32 kg dodatku filtracyjnego, takiego jak ziemia okrzemkowa.

Mieszaninę przesącza się przez prasę filtracyjną i przemywa 275 litrami wody. Do filtratu, którego objętość wynosi 780 litrów, dodaje się 156 kg chlorku sodowego, potem doprowadza się wartość pH do 3 za pomocą 12 n kwasu solnego. Przesącza ekstrahuje się następnie 260 litrami butanolu. Wy-

ciąg butanolowy zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze 35° do objętości 4 litrów. Koncentrat filtruje się. Surowy antybiotyk strąca się z wyklarowanego roztworu za pomocą 32 litrów eteru naftowego, odwirowuje, przemywa i suszy w suszarce przy 30° w próżni. Otrzymuje się tu 227 g surowego antybiotyku 9.865 RP jako proszek brązowo-czerwony o mocy 45 j/mg.

50 g powyższego surowego produktu rozpuszcza się w 200 cm³ butanolu nasyconego wodą i otrzymany roztwór chromatografuje się przy wartości pH = 4 przez kolumnę zawierającą 500 cm³ filenku glinowego. Po zaadsorbowaniu antybiotyku rozwija się i eluuje go 4 litrami butanolu nasyconego wodą. W ten sposób otrzymuje się 3 zabarwione frakcje o objętościach 450 cm³, 1500 cm³ i 1500 cm³. Pierwszą frakcję zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem do 50 cm³, potem zadaje się ją 500 cm³ heksanu otrzymując 8,3 g antybiotyku 9.865 RP o mocy 68,5 j/mg. Obie pozostałe frakcje zagęszcza się oddzielnie pod zmniejszonym ciśnieniem do 100 cm³ i każdą frakcję zadaje 1 litrem heksanu. W wyniku otrzymuje się z jednej frakcji 4,4 g antybiotyku 9.865 RP o mocy 216 J/mg, a z drugiej frakcji — 1,35 g 9.865 RP o mocy 800 j/mg.

Przykład XII. 425 litrów brzeczki przygotowanej w sposób opisany w przykładzie I (moc = 40 j/cm³) zakwasza się do wartości pH = 1,8 za pomocą kwasu szczawiowego i filtruje. Placek filtracyjny przemywa się 100 litrami wody zakwaszonej kwasem szczawiowym do wartości pH = 2 i otrzymuje się w ten sposób 500 litrów przesączu. Przesącz ekstrahuje się przy wartości pH = 8, dwa razy sukcesywnie 150 litrami wody, potem 100 litrami chloroformu. Ekstrakty się łączy i znów ekstrahuje wodą doprowadzoną do wartości pH = 4, raz 80 litrami, potem 50 litrami.

Otrzymany wodny ekstrakt alkalizuje się do wartości pH = 8 1 n roztworem sodu i ekstrahuje najpierw 40 litrami, później 20 litrami chloroformu. Ekstrakty chloroformowe zakwasza się do wartości pH = 4 roztworem kwasu octowego w chloroformie (10:100 objętościowo). Zakwaszony ekstrakt zagęszcza się przy 30° pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 50 cm³. Potem strąca się surowy antybiotyk 500 cm³ heksanu, odwirowuje się, przemywa i suszy w suszarce przy 30° w próżni. Wreszcie otrzymuje się 680 mg antybiotyku 9.865 RP w postaci czerwonego proszku, którego moc wynosi 1080 j/mg.

Przykład XIII. 500 mg antybiotyku 9.865 RP otrzymanego w sposób opisany w przykładzie IV rozpuszcza się w 100 cm³ normalnego kwasu siarkowego i otrzymany roztwór podgrzewa się w ciągu 20 minut w wodnej kąpieli. Po ochłodzeniu ekstrahuje się trzykrotnym zadaniem 200 cm³ octanu etylowego. Ekstrahowany roztwór organiczny suszy się za pomocą bezwodnego siarczanu sodu, filtruje i zagęszcza do małej objętości. Po prze-filtrowaniu, przemyciu i osuszeniu otrzymuje się 218,5 mg produktu krystalicznego.

150 mg tych kryształków rozpuszcza się w 3 cm³ chloroformu i 1,5 cm³ benzenu i otrzymany

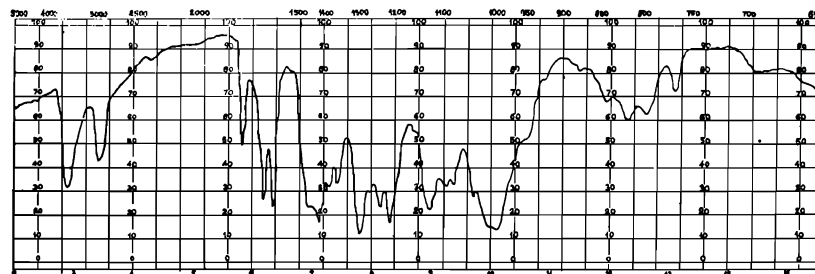
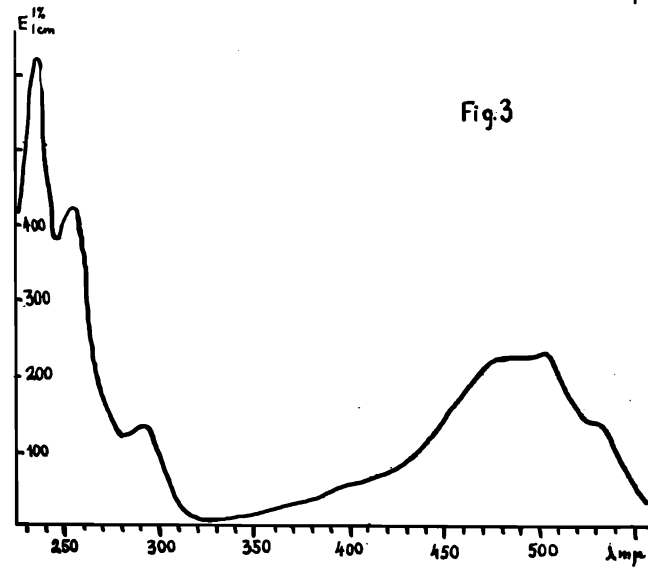
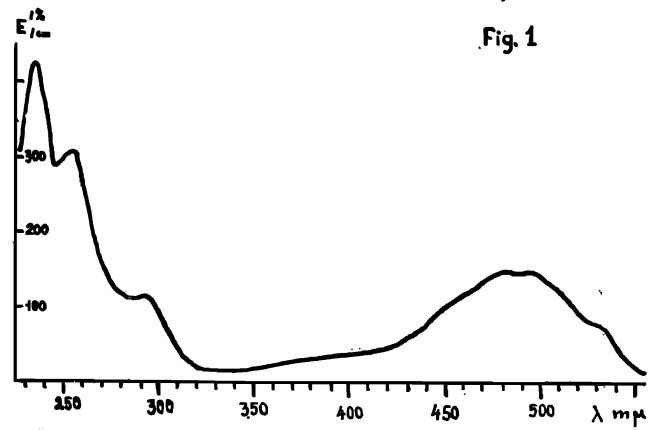
roztwór chromatografuje się na 20 arkuszach papieru Arches nr 310 nasyczonego roztworem acetonu o zawartości 20% formamidu i wywołuje się w ciągu 90 minut przy pomocy mieszaniny chloroform — benzen (2:1) nasyconej formamidem. Na 20 arkuszach wycina się główną strefę o $RF = 0,86$ i te 20 wyciętych stref rozciera się w „mikserze” w obecności metanolu. Otrzymaną mieszaninę przesącza się, zagęszcza i dodaje do niej 10 objętości wody. Otrzymany osad odsącza się, przemywa i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem. W wyniku otrzymuje się w ten sposób 120 mg produktu krystalicznego.

170 mg kryształków identycznych z otrzymanymi według powyższego sposobu rozpuszcza się w 15 cm³ dioksanu o zawartości 20% wody, dodając kroplami wodę zakwaszoną do wartości $pH = 4$ 0,1 n kwasem solnym. Powstałe kryształy odsącza się, przemywa i suszy, po czym otrzymuje się 130 mg aglikonu 9.865 RP w postaci czerwono-pomarańczowych igiełek, o temperaturze topnienia 160°, później 225—230°.

Przykład XIV. 500 mg antybiotyku 13.057 RP otrzymanego w sposób opisany w przykładzie VII poddaje się działaniu kwasu siarkowego, jak w przykładzie XIII, w odniesieniu do 9.865 RP. Otrzymuje się w ten sposób 300 mg produktu krystalicznego, który po oczyszczeniu go metodą opisaną w tymże przykładzie XIII dostarcza 202 mg aglikonu 13.057 RP w postaci czerwono-pomarańczowych igiełek o temperaturze topnienia 160°, później 225—230°. Ten aglikon jest identyczny z aglikonem 9.865 RP.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowego antybiotyku 13.057 RP, **znamienny tym**, że szczep *Streptomyces coeruleorubidus* (NRRL 3045 lub NRRL 3046) poddaje się hodowli w ciągu 2—5 dni w aerobowym, ciekłym środowisku odżywczym przy wartości $pH = 6-8$ i w temperaturze 20—35°C, zawierającym źródła węgla i azotu, takie jak węglowodany, tłuszcze, aminokwasy, sole amonowe, azotany i naturalne produkty kompleksowe zawierające te substancje i zawierającym jednocześnie sole mineralne takie jak chlorki, siarczany, fosforany i węglany metali alkalicznych i metali ziem alkalicznych, następnie wyodrębnia się antybiotyki 13.057 RP ze środowiska hodowlanego przez ekstrakcję rozpuszczalnikami nie mieszającymi się z wodą takim jak butanol, metyloizobutyloketon, octan etylu lub chloroform, przy wartości pH w zakresie 5,5—9 bądź bezpośrednio, bądź po przesączeniu środowiska przy wartości pH w zakresie 1,5—9, następnie zateżenie otrzymanego roztworu, wytrącenie surowego antybiotyku 13.057 RP, łącznie z antybiotykiem 13.213 RP, przez dodanie rozpuszczalnika, w którym antybiotyk źle się rozpuszcza, takiego jak eter naftowy lub cykloheksan, przesączenie i wreszcie oczyszczenie antybiotyku 13.057 RP metodą fizykochemiczną taką jak chromatografia lub rozdzielanie w przeciwnym kierunku.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w przypadku wytwarzania surowego antybiotyku 13.057 RP wyodrębnia się bezpośrednio osad otrzymany po dodaniu rozpuszczalnika, w którym antybiotyk źle się rozpuszcza, do zateżonego roztworu.



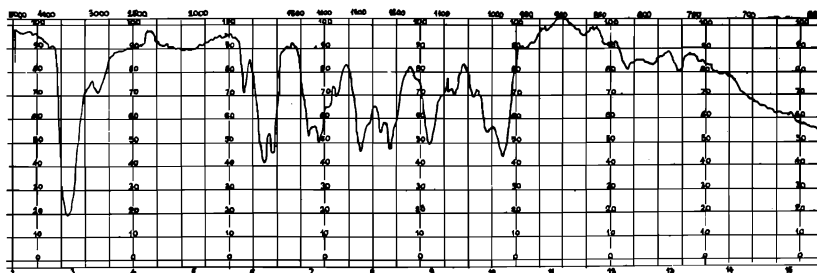


Fig.4

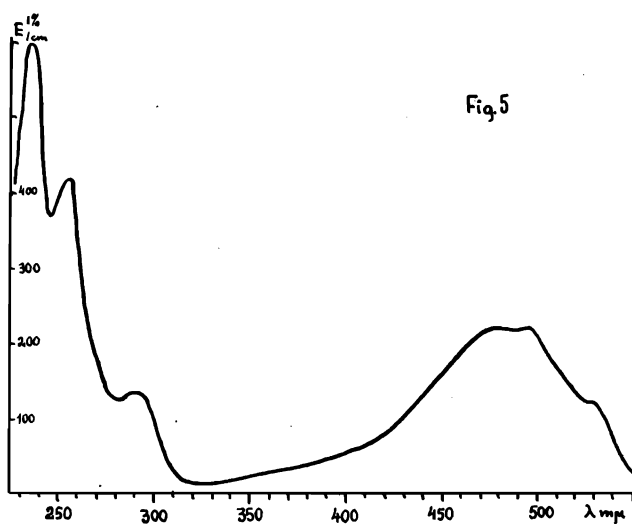


Fig.5

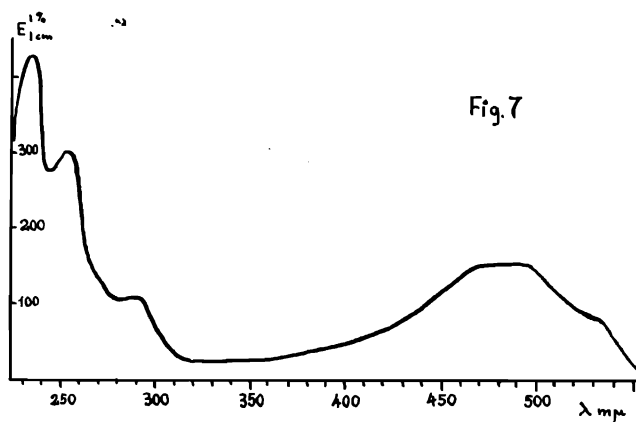


Fig.7

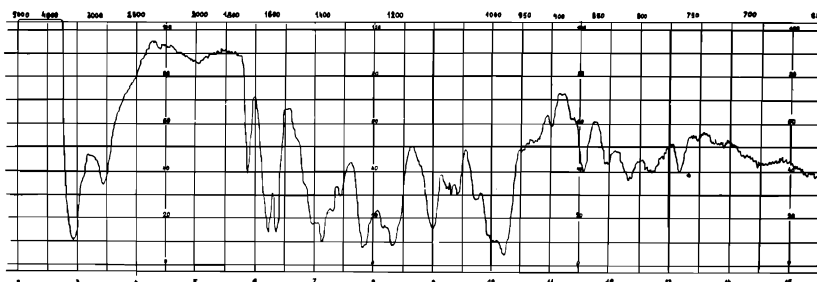


Fig.6

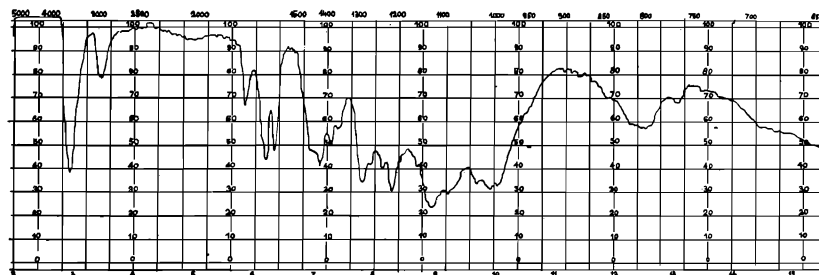


Fig. 8

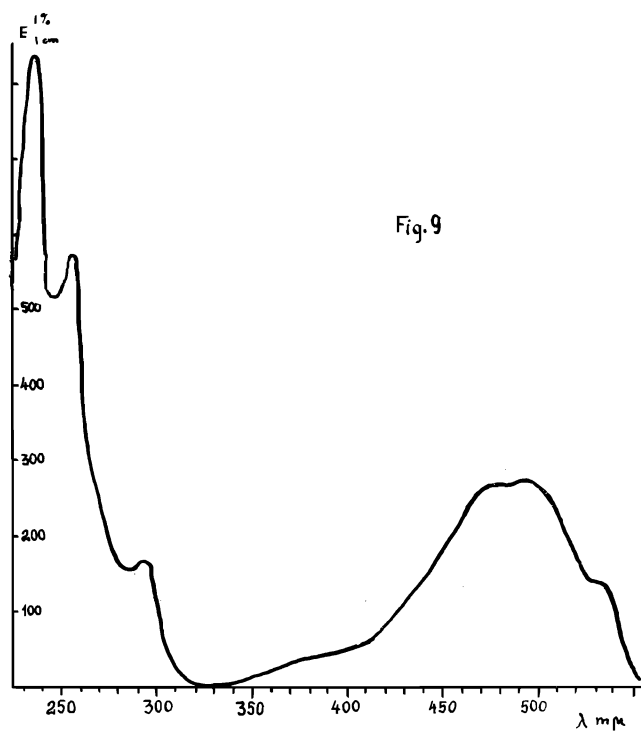


Fig. 9

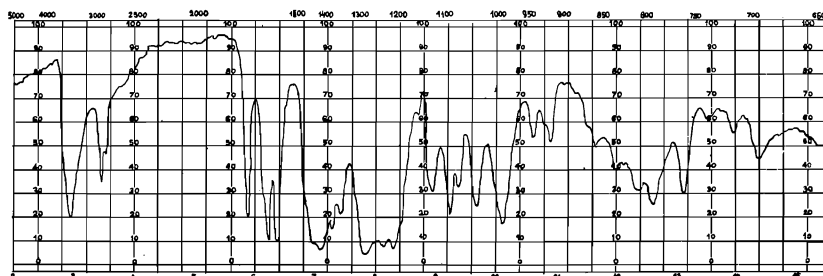


Fig. 10