

C 12 d 9/18



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 43565

Kl. 6 b, 16/03

Włodzimierz Kuryłowicz

Warszawa, Polska

Franciszek Ułak

Warszawa, Polska

Sposób otrzymywania oksytetracykliny

Patent trwa od dnia 24 listopada 1959 r.

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania oksytetracykliny, antybiotyku o szerokim zakresie działania przeciwbakteryjnego, drogą powierzchniową, tlenowej hodowli nieopisanego dotychczas szczepu promieniowca *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. oraz wydzielania oksytetracykliny z cieczy fermentacyjnej.

Stwierdzono, że ten nowy gatunek promieniowca wytwarza w ciekłym podłożu o odpowiednim składzie wyżej wspomniany antybiotyk — oksytetracyklinę. *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. został sklasyfikowany według metod podanych w odpowiednich kluczach (N. A. Krasilnikow: *Opredelitel bakterii i aktinomycetow*, Izd. Ak. Nauk SSSR, Moskwa, 1949 oraz *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams, Wilkins, Baltimore, 1948), jako drobnoustrój należący do rodzaju *Actinomyces* (Krasilnikow) względnie *Streptomyces* (Henrici, Waksman w *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*).

Antybiotyk — oksytetracyklinę wytwarzają licz-

ne gatunki promieniowców. Sposób otrzymywania oksytetracykliny został wielokrotnie opisany zarówno w piśmiennictwie naukowym, jak i patentowym. Np. w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki (nr 2.516.080), w niemieckim opisie patentowym (nr 862.647), w brytyjskim opisie patentowym (nr 648.417) podany jest sposób otrzymywania oksytetracykliny na drodze biosyntezy przy użyciu szczepu promieniowca *Streptomyces rimosus*, zbliżonego swymi cechami hodowlanymi i morfologicznymi do znanego, opisanego w r. 1894 gatunku *Streptomyces albus* (Rossi-Doria T.: *Ann. Ist. Ig. Sper. Roma* N. S., 1894, 1, 399) Waksman, Henrici. W brytyjskim opisie patentowym (nr 713.795) oraz w kanadyjskim opisie patentowym (nr 520.836) podano sposób otrzymywania oksytetracykliny z cieczy fermentacyjnej promieniowca nazwanego *Streptomyces platensis*. W szwajcarskim opisie patentowym (nr 331.988) opisano sposób wytwarzania oksytetracykliny przez nowy gatunek promieniowca, *Streptomyces vendargensis* sp. nov.

Również i w francuskich publikacjach naukowych, opisano nowy gatunek promieniowca, wytwarzającego oksytetracyklinę. Gatunkowi temu nadano nazwę *Streptomyces armillatus* (Mancy-Courtillet, Pinert-Sindico: Ann. Inst. Pasteur, 1954, 87, 580). W pracy S. A. Waksmana i H. A. Lechevaliera: „Actinomycetes and their antibiotics“, Williams, Wilkins, Baltimore 1953, przy opisie gatunku *Streptomyces griseoflavus* (Krainsky) Waksman, Henrici (Krainsky A.: Zbl. f. Bakt. II, 1914, 41, 639) autorzy wymieniają jego silnie antagonistyczne właściwości i stwierdzają, że szczep ten jest producentem oksytetracykliny i rimocydyny. O izolowaniu szczepów licznych promieniowców wytwarzających oksytetracyklinę donosi również praca włoska (Silvestri: R. C. Ist. Sup. Sanità, Roma, 1955, 18, 1227). Obie przytoczone prace, zwłaszcza praca włoska, zwracają uwagę na pewne podobieństwo, jakie zachodzi między szczepem *Streptomyces rimosus* i znanym gatunkiem promieniowca *Streptomyces griseoflavus*.

W trakcie poszukiwań antagonistycznych promieniowców w Polsce izolowano szczep promieniowca, który swymi cechami morfologicznymi, hodowlanymi i fizjologicznymi wyraźnie się różni od szczepów dotychczas opisanych w piśmiennictwie patentowym i naukowym. Szczep ten poddano bardzo dokładnym badaniom taksonomicznym,

stosując wszystkie współczesne testy używane do identyfikacji gatunków (species), rodzaju (genus) promieniowców (*Actinomyces*, *Streptomyces*). Przekonano się, że badany szczep należy do nowego, nie opisanego dotychczas gatunku, dla którego zaproponowano nazwę *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. Zróżnicowanie przeprowadzono z następującymi gatunkami promieniowców, wytwarzającymi oksytetracyklinę: *Streptomyces griseoflavus*, *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces armillatus*, *Streptomyces platensis* i *Streptomyces vendargensis*.

Poniższa tablica 1 podaje cechy hodowlane i niektóre cechy fizjologiczne szczepu *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. oraz szczepu *Streptomyces rimosus* 2234. Zaznacza się, że w celu przeprowadzenia badań taksonomicznych *Actinomyces varsoviensis* sp. nov., w stosowanych testach posługiwano się nie tylko podłożami „naturalnymi“, takimi jak ziemniak, agar ziemniaczany etc., lecz użyto również podłoży dobrze zdefiniowanych czyli tzw. „syntetycznych“. *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. różni się wybitnie od gatunku *Streptomyces rimosus*, którego szczep wzorcowy uzyskano z kilku kolekcji zagranicznych, a mianowicie: American Type Culture Collection i National Collection of Industrial Bacteria, Teddington, Anglia oraz Northern Regional Research Laboratory, Peoria, 111.

Tablica 1

Actinomyces varsoviensis sp. nov.

Podłoże	Stopień wzrostu	Grzybnia powietrzna	Grzybnia podstawowa	Pigment rozpuszczalny
Agar asparaginowy z glukozą (płytki)	+++ 120	biała	bezbarwna	brak
Agar Sabouraud z maltozą	+++ 120	biała	bezbarwna	koloru siarki (12 L-4)
Agar Czapek-Doxa z sacharozą	+++ 120	biała	bezbarwna	brak
Agar z dekstryną	++/+++ 48—72	biała	bezbarwna	brak
Ziemniak	+++ 72	biała	lniana (12 B-2)	brak
Agar ziemniaczany z glukozą	+++ 72	biała	bezbarwna	brak
Agar z płatkami owsianymi	+++ 72	biała	bezbarwna	brak
Podłoże tryptonowe stałe	+++ 48	biała	bezbarwna	brak
Podłoże cytrynianowe	+++ 72	biała	bezbarwna	brak
Podłoże Lindenbeina	+++ 72	biała	bezbarwna	brak

Podłoże	Stopień wzrostu	Grzybniła powietrzna	Grzybniła podstawowa	Pigment rozpuszczalny
Podłoże tryptonowe płynne	+++ 48	biała wydziela	bezbarwna siarkowodor	brak
Podłoże Emersona płynne	++/+++ 48-72	biała	bezbarwna	brak
Agar syntetyczny z peptonem	+++ 72	biała	bezbarwna	ciemnożółty (12 I-5)
Buflon mięsny	24-48	biała	kremowa	brak
Agar ze skrobią	+++ 120	biała	bezbarwna	brak
Mleko z lakmusem	72	alkalizuje, ścina		
Zelatyna	72	nie upłynnia (po dłuższym czasie upłynnia częściowo)		
Agar z krwią	72	nie wywołuje hemolizy krwinek		
Agar z azotanami	++/+++ 48-72	biała nie redukuje azotanów	bezbarwna	koloru pirytu (Y) (12 I-3)
Streptomyces rimosus N.H.K.L. 2234				
Agar asparaginowy z glukozą	++ 48-72	brak	beżowa	cytrynowy (Y) (10 J-2)
Agar Sabouraud z maltozą	+++ 120	brak	bażantowa (13 L-12)	siena (13 L-10)
Agar Czapek-Doxa z sacharozą	+++ 120	brak	bezbarwna	brak
Agar z dekstryną	++ 72-96	brak	jasnobrązowa (13 D-4)	brąz peruwiański (13 L-10)
Ziemniak	+++ 72	biała	orzech laskowy (13 J-9)	bażantowy (13 L-12)
Agar ziemniaczany z glukozą	+++ 72	brak	bezbarwna	orzech laskowy (13 J-8)
Agar z płatkami owsianymi	+++ 120	brak	zielonożółta (12 D-2)	Isabella (13 K-7)
Podłoże tryptonowe stałe	+++ 120	brak	żółtozielona (12 F-2)	oliwkowy (12 L-2)
Podłoże cytrynianowe	++ 120	brak	jasnożółta (12 E-5)	brak
Podłoże Lindenbeina	+++ 120	brak	orzech laskowy (13 J-8)	antyczne złoto (12 L-2)
Podłoże tryptonowe płynne	+++ 48	nie wydziela siarkowodoru		
Podłoże Emersona	++/+++ 48-72	biała	bezbarwna	brak
Agar syntetyczny z peptonem	++/+++ 24-48	brak	bezbarwna	Isabella (13 K-7)
Buflon mięsny	24-48	brak	bezbarwna	brak
Agar ze skrobią	++ 96	brak	wierzbowa (12 L-6)	tenis (12 L-6)
Mleko z lakmusem	24-72	zakwasza, peptonizuje		
Zelatyna	48	całkowicie upłynnia		
Agar z krwią	48	wywołuje hemolizę krwinek		
Agar z azotanami	++ 48	biała	jasnobrązowa (13 D-3)	tenis (12 L-6)
redukuje azotany do azotynów				

W tablicy 1: ++ oznacza średni stopień wzrostu.
+++ oznacza obfity stopień wzrostu.
Liczby oznaczają godziny hodowli,
w których stwierdzono oznaczony sto-

pień wzrostu. Barwy oznaczono według „dictionary of color“ Maerza i Paula, Mc Graw-Hill, New York, 1950.

Poniżej podana jest tablica porównawcza między *actinomyces varsoviensis*, *streptomyces rimosus* i *streptomyces albus*

Tablica 2

<i>Actinomyces varsoviensis</i>	<i>Streptomyces rimosus</i>	<i>Streptomyces albus</i> (Rossi Doria amend. Krainsky) Waksman, Henrici
Grzybnia powietrzna skąpa	Grzybnia powietrzna skąpa	Grzybnia powietrzna bogata
Grzybnia powietrzna biała	Grzybnia powietrzna nie całkiem biała	Grzybnia powietrzna biała
Wygląd kolonii i hodowli gładki	Charakterystyczny wygląd kolonii i hodowli	Wygląd kolonii nie charakterystyczny
Ziemniak: grzybnia podstawowa koloru lnianego	Ziemniak: grzybnia podstawowa, żółta	Ziemniak: kolonie białe
Mleko: koagulacja, peptonizacja	Mleko: hydroliza, peptonizacja	Mleko: koagulacja, peptonizacja
Zelatyna: nie upływnia lub po dłuższym czasie częściowe upłynnienie	Zelatyna: nie całkowite upłynnienie	Zelatyna: intensywne upłynnienie
Azotany: nie redukuje do azotynów	Azotany: redukcja do azotynów	Azotany: redukcja do azotynów
Skrobia: brak hydrolizy	Skrobia: lekka hydroliza	Skrobia: hydroliza lub brak hydrolizy
H ₂ S w podłożu tryptonowym: nie wydziela	H ₂ S w podłożu tryptonowym: nie wydziela ⁴⁾	—
Krwinki czerwone: nie hemolizuje	Krwinki czerwone: hemolizuje ⁵⁾	—
Wytwarza oksytetracyklinę	Wytwarza oksytetracyklinę	Wytwarza aktynomycynę, endomycynę, tiolutynę

Objaśnienie: Kreska — oznacza brak danych;
cyframi 1) i 2) oznaczono dane dla szczepu *Streptomyces rimosus* N.R.R.L. 2234. Inne dane dotyczące *S. albus* i *S. rimosus* pochodzą

z niemieckiego opisu patentowego nr 862.047 oraz z publikacji Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams, Wilkins, Baltimore, 1948.

W tablicy 3 zestawiono dane odnoszące się do szczepu *Streptomyces armillatus*, a uzyskane na podstawie opisu zawartego w pracy Mancy-

-Courtillet D. i Pinnert-Sindico S.: „Une nouvelle espece de *Streptomyces*: *Streptomyces armillatus*“, Ann. Inst. Pasteur, 1954, 87, 580.

Tablica 3

Actinomyces varsoviensis sp. nov.

Podłoże	Stopień wzrostu	Grzybnia powietrzna	Grzybnia podstawowa	Pigment rozpuszczalny
Agar asparaginowy z glukozą	+++	biała	bezbarwna	brak
Agar Czapek-Doxa z sacharozą	+++	biała	bezbarwna	brak
Podłoże z glukozą i peptonem	+++	biała	bezbarwna	ciemnożółty (Pl 12, I-5)
Podłoże Emersona	++/+++	biała	bezbarwna	brak
Ziemniak	+++	biała	lniana (Pl 12, B-2)	brak
Podłoże ze skrobią	+++	biała	bezbarwna	brak
Podłoże z azotanami	++/+++	nie redukuje azotanów do azotynów		
Żelatyna	+++	nie upłynnia żelatyny, po dłuższym czasie częściowo upłynnia		
Mleko w temperaturze 26°C	+++	koaguluje, peptonizuje, zakwasza		
Streptomyces armillatus				
Agar asparaginowy z glukozą	+++	słabo rozw. biała	szarozółtawa, beżowa	brak
Agar Czapek-Doxa z sacharozą	+	brak	bezbarwna	brak
Podłoże z glukozą i peptonem	+++	słabo rozw. biała	szarozółtawa, gładka	brak
Podłoże Emersona	+++	słabo rozw.	żółtoszara, gładka	bladoróżowy przechodzący w bladobrazowy
Ziemniak	++	słabo rozw.	szarozółtawa, gładka	brak
Podłoże ze skrobią	+	nie hydrolizuje skrobi		
Podłoże z azotanami	+	nie redukuje azotanów do azotynów		
Żelatyna	++	częściowe upłynnienie po 40 dniach		
Mleko w temp. 26°C	++	koaguluje, peptonizuje, zakwasza		

Objaśnienie: stopień wzrostu ± bardzo słaby, + słaby, ++ średni, +++ dobry do b. dobry (obfity).

Actinomyces varsoviensis sp. nov. wykorzystuje następujące źródła węgla: fruktozę, glukozę, galaktozę, mannozę, trehalozę, glicerol, mannitol, tursztynian sodu. Słabo wykorzystywane są: rafinoza, sacharoza, laktoza, inozytol oraz octan sodowy. *Actinomyces varsoviensis* nie wykorzystuje: ramnozy, maltozy, dulcytolu i skrobi.

Z podłoża „syntetycznego“ *Streptomyces armillatus* wykorzystuje następujące źródła węgla: glukozę, galaktozę, mannozę, glicerol, erytryt. Słabiej wykorzystywane są: arabinoza, rafinoza, mannitol, octan sodowy, cytrynian sodowy i skrobia. *Streptomyces armillatus* nie wykorzystuje następujących źródeł węgla: ksylozy, ramnozy, lewulozy, sacharozy, maltozy, laktozy, sorbitolu, dulcytolu, inozytolu i winianu sodowego.

Cechy fizjologiczne szczepu *Actinomyces varsoviensis*, odnoszące się do jego zdolności przy-

swajania źródeł węgla z podłoża „syntetycznych“ (met. Pridhama-Gottlieba) przedstawia tablica 4.

Tablica 4

Wykorzystanie źródeł węgla z agaru „syntetycznego“ przez *A. varsoviensis*, *S. armillatus* i *S. rimosus*:

Źródło węgla	<i>Actinomyces varsoviensis</i> sp. nov.	<i>Streptomyces armillatus</i>	<i>Streptomyces rimosus</i> 2234
Głukoza	+++	+++	+++
Galaktoza	+++	+++	+++
Mannoza	+++	+++	++
Fruktoza	+++	.	+++
Laktoza	++	—	++
Maltoza	—	—	+
Sacharoza	±	—	±
Rafinoza	+	++	++
Ramnoza	—	—	—
Trehaloza	+++	—	++
Skrobia	—	++	++
Glicerol	+++	+++	+++
Mannitol	+++	++	++
Dulcytol	—	—	—
Inozytol	.	—	.
Bursztynian sodu	+++	.	++
Octan sodu	+++	++	++

Objaśnienie: znaki ±, +, ++, +++ oznaczają stopień wykorzystania źródła węgla, określony stopień wzrostu badanego szczepu.

— oznacza brak wzrostu

. oznaczenia nie wykonano

Dane dotyczące *S. armillatus*, *S. rimosus* i *S. griseoflavus* pochodzą z pracy Mancy-Courtillet D. i Pinnert-Sindico S. (Ann. Inst. Pasteur, 1954, 87, 580). Dane dotyczące *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. wskazują na to, że szczep

ten jest zbliżony niektórymi swymi cechami do szczepu *Streptomyces armillatus* (brak redukcji azotanów do azotynów, brak hydrolitycznych właściwości dla skrobi). Od szczepu tego różni się zachowaniem na żelatynie i charakterem wzrostu na niektórych podłożach, jak to wynika z danych zawartych w tablicy 5.

Na podstawie przytoczonych danych szczep *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. różni się wybitnie od szczepów *Streptomyces rimosus* i *Streptomyces griseoflavus*.

Tablica 5

Podłoże	<i>Actinomyces varsoviensis</i>	<i>Streptomyces armillatus</i>	<i>Streptomyces rimosus</i>	<i>Streptomyces griseoflavus</i>
Podłoże syntetyczne	słaby wzrost, brak pigmentu	słaby wzrost, brak pigmentu	brak wzrostu	grzybnia podstawowa, pomarańczowa lub brązowo-różowa, pigment bladożółty
Ziemniak	grzybnia podstawowa, barwy lnianej, lekko pomarszczona, brak pigmentu	grzybnia podstawowa, szarżółta, gładka, brak pigmentu	grzybnia podstawowa, brunatna, pomarszczona, pigment bladożółty	grzybnia podstawowa, typu porostu, kremowa lub brązowo-różowa, brak pigmentu
Żelatyna	upłynnienie częściowe po dłuższym czasie	upłynnienie powolne, pigment brąz. różowy	upłynnienie częściowe, brak pigmentu	upłynnienie słabe, pigment bladożółtawy
Mleko w temp. 26°C	alkalizuje, ścina, peptonizuje, zakwasza	ścięcie, peptonizacja, zakwaszenie	nie zmienia	szybka peptonizacja bez koagulacji.
Podłoże Emer-sona	grzybnia podstawowa, bezbarwna, gładka, pigmentu brak lub bladożółty	grzybnia podstawowa, szarżółtawa, gładka, pigment blado-różowy	grzybnia podstawowa, pomarańczowa, popękana, pigment żółto-brąz.	grzybnia podstawowa, typu porostu, kremowa lub brunatna, pigment żółtawy.
Azotany	brak redukcji do azotynów	brak redukcji do azotynów	redukcja do azotynów	redukcja do azotynów
Skrobia	brak hydrolizy	brak hydrolizy	lekka hydroliza	ograniczona hydroliza

Dane dotyczące *Streptomyces vendargensis* i *Streptomyces rimosus* pochodzą z szwajcarskiego opisu patentowego nr 331.998. Opisy szczepów tam podanych nie są wystarczające, gdyż nie włączono do nich charakterystyk podstawowych cech fizjologicznych. Zróznicowanie między *S. vendargensis* i *S. rimosus* oparto w przytoczonym opisie patentowym głównie na tym, że *S. vendargensis* wytwarza obok oksytetracykliny jeszcze inny antybiotyk „vengicid“, podczas gdy *S. rimosus* obok oksytetracykliny wytwarza drugi antybiotyk „rimocidin“. Obydwa antybiotyki „vengicid“ i „rimocidin“ różnią się od siebie cechami fizyko-chemicznymi i biologicznymi.

Na podstawie przytoczonych danych dotyczących charakterystyki hodowli trzech porównywanych szczepów promieniowców, można stwierdzić zasadnicze różnice między *Actinomyces varsoviensis* i dwoma pozostałymi szczepami (patrz tablica 6 i 7). W przytoczonym porównaniu szczep *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. łatwiej wytwarza grzybnie powietrzna, niż dwa porównywane szczepy, cechuje się raczej bezbarwną lub lekko żółtą grzybnia podstawową oraz wytwarza skąpe ilości żółtego pigmentu dyfundującego do podłoża. W rzeczywistości różnice między porównywanymi szczepami, zwłaszcza między *Actinomyces varsoviensis* i *Streptomyces rimosus* są bardziej wyraźne i dotyczą cech fizjologicznych. Różnice te wskazuje tablica 7.

Actinomyces varsoviensis sp. nov.

Podłoże	Grzybnia powietrzna	Grzybnia podstawowa	Pigment rozpuszczalny
Agar z mąką owsianą	biała	bezbarwna	brak
Agar Emersona	biała	bezbarwna	brak
Agar Sabouraud	biała	bezbarwna	koloru siarki (12 L-4)
Agar ziemniaczany	biała	bezbarwna	brak
Agar z cytrynianem sodu	biała	bezbarwna	brak
Agar z glukozą i azotanami	biała	bezbarwna	koloru pirytu (12 L-3)
Ziemniak	biała	lniana (12 B-2)	brak
Agar ze skrobią	biała	bezbarwna	brak
<i>Streptomyces vendargensis</i>			
Podłoże	Grzybnia powietrzna	Grzybnia podstawowa	Pigment rozpuszczalny
Agar z mąką owsianą	brak	jasnożółta (11 F-4)	brak
Agar Emersona	biała	jasnobrązowa (13 D-5)	brak
Agar Sabouraud	biała	żółtawa (12 E-3)	brak
Agar ziemniaczany	brak	brązowa	brak
Agar z cytrynianem sodu	brak	biała (2 A-1)	brak
Agar z glukozą i azotanami	brak	jasnożółta (10 B-1)	brak
Ziemniak	biała	żółta lub brązowa (12 D-5), (13 L-7)	brak
Agar ze skrobią	biała	jasna, bezbarwna	brak

Tablica 7

Podłoże	Actinomyces varsoviensis		Streptomyces vendargensis		Streptomyces rimosus	
Agar z mąką owsianą	A	biała	A	brak	A	biała
	B	bezbarwna	B	jasnożółta (11 F-4)	B	ciemnobrązowa (8 C-12)
	P	brak	P	brak	P	ciemny
Agar Emersona	A	biała	A	biała	A	biała
	B	jasnobrązowa (13 D-5)	B	jasnobrązowa (13 D-5)	B	ciemnobrązowa (15 A-12)
	P	brak	P	brak	P	ciemny
Agar Sabouraud	A	biała	A	biała	A	żółto-biała
	B	bezbarwna	B	żółtawa (12 E-3)	B	czarno-brązowa
	P	koloru siarki (12 L-4)	P	brak	P	ciemny
Agar ziemniaczany	A	biała	A	brak	A	biała
	B	bezbarwna	B	brązowa	B	brązowa do fioletowej
	P	brak	P	brak	P	brak
Agar z cytrynia- nem sodu	A	biała	A	brak	A	brak
	B	bezbarwna	B	biała (2 A-1)	B	szarozielona (3 A-1; 13 J-5)
	P	brak	P	brak	P	brak
Agar z glukozą i azotanami	A	biała	A	biała	A	brak
	B	bezbarwna	B	jasnożółta (10 B-1)	B	brązowa (13 K-9)
	P	koloru pirytu (12 L-3)	P	brak	P	żółty
Ziemniak	A	biała	A	biała	A	biała
	B	lniana (12 B-2)	B	żółta lub brązowa (12 D-5, 13 L-7)	B	żółta (12 E-5)
Agar ze skrobią	A	biała	A	biała	A	biała
	B	bezbarwna	B	jasna, bezbarwna	B	brązowa
	P	brak	P	brak	P	żółto-brązowy

Objaśnienie: A — grzybnia powietrzna
B — grzybnia podstawowa

P — pigment rozpuszczalny w pod-
łożu

Do nowo opisanego sposobu wytwarzania oksytetracykliny nadają się obok *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. również niektóre jego „naturalne” mutanty oraz mutanty „sztuczne” indukowane za pomocą znanych, silnie działających mutagenów, jak promienie nadfioletowe, promienie Roentgena, iperyt azotowy i inne. Mutanty te różnią się niekiedy znacznie od uprzednio opisanego szczepu macierzystego *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. Najistotniejsze różnice odnoszą się do zabarwienia grzybni podstawowej, pigmentu rozpuszczalnego w podłożu, sposobów wykorzystania źródeł węgla i azotu z podłoży „syntetycznych”, a przede wszystkim różnice te odnoszą się do aktywności antybiotycznej.

Do selekcji „naturalnych” i „sztucznych” mutantów zastosowano po raz pierwszy wśród promieniowców sposób charakterystyki szczepu, który nazwano „wzorem populacyjnym”. Pozwala on nie tylko na dokładny opis populacji danego mutantu, lecz również na próby odnalezienia związku między cechami morfologicznymi populacji i jej aktywnością antybiotyczną. Sposób ten w znacznym stopniu ułatwia selekcję wysoko wydajnych pod względem antybiotycznym szczepów w przypadku *Actinomyces varsoviensis* sp. nov.

Zastosowano też nową i dotychczas nieopisaną metodę szybkiej selekcji wysoko wydajnych pod względem antybiotycznym kolonii za pomocą metody „dwu bloków agarowych o różnej średnicy” (o stosunku 1:2 lub 1:4), pozwalającą na porównawcze, ilościowe określenie antybiotyku — oksytetracykliny, wytwarzanej przez badany mutant. Jest to prosta, tania i szybka metoda porównawcza, pozwalająca w ciągu 18 godzin na wyselekcjonowanie z populacji mutantów o wydajności wyższej od tej, jaką wykazuje macierzysty szczep *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. Szczegółowy opis obydwu metod selekcji podano na jednym z przykładów, dotyczących badań nad zmiennością szczepu *Streptomyces rimosus* 8229, w Biuletynie Informacyjnym Instytutu Antybiotyków, Warszawa, 1959, 2, zesz. 6.

Na podstawie przytoczonych danych porównawczych ze szczepami promieniowców: *Streptomyces albus*, *S. griseoflavus*, *S. rimosus*, *S. armillatus*, *S. platensis* i *S. vendargensis*, stwierdzono, że *A. varsoviensis* sp. nov. nie jest identyczny z żadnym z wymienionych gatunków.

Actinomyces varsoviensis sp. nov. jest nowym, dotychczas nieopisanym gatunkiem promieniowca, wytwarzającym oksytetracyklinę.

Dla otrzymania oksytetracykliny szczep *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. hoduje się pod-

powierzchniowo w ciekłych podłożach na trzaskawce, w zamkniętych naczyniach zabezpieczających hodowlę od zanieczyszczenia innymi drobnoustrojami, a równocześnie zapewniających odpowiedni dostęp jałowego powietrza lub tlenu.

Niżej podano warunki, w jakich odbywa się hodowla szczepu *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. korzystna dla biosyntezy oksytetracykliny i dotyczące cyklu biosyntezy, podłoża, temperatury hodowli, właściwej fermentacji i czasu jej trwania, warunków napowietrzania i innych.

Szczep *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. przechowuje się na odpowiednim podłożu sporulacyjnym, albo w postaci zliofilizowanej.

Szczepy *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. na agarach z podłożem sporulacyjnym można przechowywać bez zmian około 6 tygodni w zamrażarce (-20°C) i chłodni ($+4^{\circ}\text{C}$) oraz około 3—6 miesięcy w temperaturze pokojowej (około $+18^{\circ}\text{C}$). Przy przechowywaniu w temperaturze pokojowej, w celu uniknięcia ewentualnych niekorzystnych zmian, jakie mogą zachodzić w hodowli, wlewa się do probówek z agarem skośnym kilka ml ciekłej, wyjałowionej parafiny, która powinna pokryć całą powierzchnię hodowli.

Actinomyces varsoviensis sp. nov. można liofilizować w odpowiednim nośniku białkowym, węglowodanowym, w roztworach aminokwasów lub niektórych kwasów organicznych, często z dodatkiem substancji „ochronnej” dla uniknięcia strat żywotności przy przywracaniu zliofilizowanego materiału do stanu ciekłego. Stwierdzono, że najlepszym nośnikiem dla zarodników *Actinomyces varsoviensis* jest mieszanina 10% roztworu sacharozy i 1% roztworu żelatyny. Wilgotność końcowa zliofilizowanego materiału powinna się wahać w granicach od 0,2—1%. Ampułki lub flaszki, w których przechowuje się liofilizowane zarodniki *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. powinny być szczelnie zamknięte (zatopione) pod zmniejszonym ciśnieniem, wynoszącym od 30 do 100 μ Hg lub powinny zostać napełnione azotem.

Zarodniki szczepu *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. można też przechowywać w mieszaninie ziemi z piaskiem w temperaturze pokojowej (około $+18^{\circ}\text{C}$) lub w temperaturze chłodni (około $+4^{\circ}\text{C}$). Ziemia z piaskiem, do której wprowadzono zawieszinę zarodników może zostać powoli wysuszona w temperaturze pokojowej, lub wysuszona ze stanu zamrożenia w wysokiej próżni.

Innym wreszcie sposobem przechowywania zarodników szczepów *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. jest przechowywanie ich na uprzednio wyjałowionych i wysuszonych produktach roś-

linnych, np. na różnego rodzaju kaszach (jagły). Zarodniki po uprzedniej kilkudniowej inkubacji w odpowiedniej temperaturze (24–26°C) rozmieszczają się na całej kulistej powierzchni ziaren roślinnych i mogą być następnie zawieszone w wodzie i służyć do zaszczepienia płynnego podłoża posiewowego.

Wymienione sposoby przechowywania szczepu *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. zabezpieczają ten szczep przed zmiennością jego cech fizjologicznych i właściwości antybiotycznych.

Podłoże sporulacyjne dla szczepu *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. może zawierać obok naturalnych źródeł azotu np. wyciągu ziemniaczanego, wyciągu z otrębów pszenicznych oraz innych wyciągów roślinnych lub zwierzęcych, również aminokwasy, siarczan amonowy lub azotan sodowy. Źródłem węgla mogą być cukry proste lub wielocukry, alkohole wyższe, melasa, wyciąg słodowy i inne. Ponad to podłoże sporulacyjne może zawierać dodatek soli mineralnych oraz dodatek mikroelementów, np. soli kobaltu w ilości od 0,1 do 1 mg %. Wreszcie podłoże zawiera od 1,5 — 3% agaru.

Jako inoculum służące do szczepienia podłoża posiewowego, służyć może 6–14-dniowa hodowla *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. w temperaturze optymalnej 26°C, z której sporządza się zawiesinę zarodników.

Skład podłoży sporulacyjnych dla *Actinomyces varsoviensis* sp. nov.:

Podłoże 1

Glukoza	10 g
CoCl ₂	0,0005 g
Agar	25 g
Wyciąg ziemniaczany	1000 ml
Wyciąg z ziemniaków (otrzymuje się przez 2–3-godzinną ekstrakcję w parze bieżącej, 1 części wagowej ziemniaków z 1 częścią wagową wody pH naturalne)	

Podłoże 2

Wyciąg namokowy kukurydzy (50%)	4 g
Skrobia ziemniaczana	15 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	4 g
KH ₂ PO ₄	2 g
CaCO ₃	3 g
Agar	15 g
Woda destylowana	1000 ml
pH 6,6–6,8	

W biosyntezie oksytetracykliny przez szczep *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. na skalę przemysłową stosuje się trójetapowy cykl hodowla-

ry złożony z przygotowania wegetatywnego materiału posiewowego na trzęsawce, przygotowania większej objętości inoculum posiewowego, wegetatywnego w tanku fermentacyjnym i z właściwej fermentacji, podczas której *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. wytwarza antybiotyki — oksytetracyklinę.

We wszystkich trzech etapach biosyntezy na skalę przemysłową stosuje się podpowierzchniową hodowlę zarówno na trzęsawce, jak i w tankach fermentacyjnych różnej objętości. Tanki te powinny być odpowiedniej budowy, zaopatrzone w urządzenia pozwalające na ciągle napowietrzanie hodowli za pomocą jałowego powietrza, mieszanie podłoża, utrzymywanie stałej, żądanej temperatury oraz w urządzenia pozwalające na kontrolę i rejestrację przebiegu fermentacji. Urządzenia te umożliwiają oznaczanie i utrzymywanie optymalnego pH podłoża, uzupełnienie składników podłoża wyczerpanych w czasie fermentacji, np. źródeł węgla, wprowadzania związków pobudzających wytwarzanie oksytetracykliny przez *Actinomyces varsoviensis* sp. nov., środków przeciw pienieniu się podłoża itp.

Poszczególne etapy cyklu hodowlanego *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. przy otrzymywaniu oksytetracykliny w skali przemysłowej cechują się odmiennym składem i odmiennym pH pożywek, odmienną temperaturą i czasem hodowli oraz odmiennymi warunkami jej napowietrzania.

Podłoże posiewowe i właściwe podłoże produkcyjne powinno zawierać źródło azotu organicznego lub nieorganicznego, lub źródło będące mieszaniną uprzednio wymienionych, źródło węgla, źródło soli mineralnych, źródło mikroelementów oraz węglan wapniowy.

Dla wytworzenia grzybni i antybiotyku oksytetracykliny, szczep *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. i jego „naturalne” lub „sztuczne” mutanty pokrywają na ogół swe zapotrzebowanie na sole mineralne i mikroelementy z tzw. „naturalnych” składników podłoża pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego, stanowiących główne źródło azotu w pożywce (np. wyciąg namokowy kukurydzy, wyciąg mięsny itp.).

Z najczęściej używanych źródeł azotu wymienić należy wyciąg mięsny, pepton, mąkę rybną, drożdże, wyciąg drożdżowy, hydrolizat drożdżowy, kazeinę, kwaśny hydrolizat kazeiny, kazeinę trawioną zaczynem trzustkowym, wyciąg namokowy kukurydzy, mąkę sojową, wyciągi i hydrolizaty z tej mąki, mąkę z orzeszków ziemnych, zmielone orzeszki ziemne, wyciągi i hydrolizaty z orzeszków ziemnych, mąkę z nasion bawełny, mąkę z nasion słonecznikowych i inne

naturalne źródła azotu pochodzenia roślinnego i zwierzęcego oraz wyciągi, namoki i hydrolizaty z nich sporządzone. Zamiast lub obok wymienionych źródeł azotu mogą być użyte, jako składniki podłoża siarczan amonowy lub azotany. Dodatek niektórych z wymienionych źródeł azotu np. wyciągu namokowego kukurydzy do pożywki, w której głównym źródłem azotu są zmielone orzeszki ziemne, posiada pobudzający wpływ na wytwarzanie oksytetracykliny przez *Actinomyces varsoviensis* sp. nov.

Pośród źródeł węgla można użyć rozpuszczalnych lub nierozpuszczalnych węglowodanów, np. sacharozy, maltozy, glukozy i innych cukrów prostych lub ich mieszaniny, skrobi, mąki ziemniaczanej, mąki kukurydzianej, wyciągu słodowego lub mieszaniny z wymienionymi uprzednio cukrami prostymi. Jako źródła węgla można użyć też alkoholi wyższych, jak np. glicerol, mannitol itp. Dla niektórych „naturalnych” i „sztucznych” mutantów *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. odpowiednim źródłem węgla okazały się oleje roślinne, np. olej arachidowy, sojowy, słonecznikowy. Procent poszczególnych składników podłoża powinien być dla każdego mutantu ustalony oddzielnie. Dla cukrów prostych wynosi on 0,5–5%, dla olejów (jako źródła węgla) 0,5–3%.

Poniżej podano krótką charakterystykę trójetapowego cyklu hodowli *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. prowadzącego do biosyntezy oksytetracykliny w skali przemysłowej.

I etap cyklu fermentacyjnego trwa 24–48 godzin w zależności od ilości zarodników *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. użytych do posiewu, od składu podłoża, temperatury hodowli, intensywności napowietrzania hodowli, która z kolei zależy od typu trzęsawki, (liczby wstrząsów względnie obrotów oraz skoku) wreszcie od kształtu naczynia i stosunku objętości naczynia do objętości zawartej w nim pożywki.

Dla *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. optymalnymi w I etapie okazały się następujące warunki: 2–5% zawiesiny zarodników 1 skośnego agaru o podanym uprzednio składzie; podłoże zawierające wyciąg namokowy kukurydzy, mąkę z orzeszków ziemnych, siarczan amonowy, skrobię, chlorek sodowy i węglan wapniowy w odpowiednim stosunku, 80 ml tego podłoża umieszcza się w kolbach Erlenmeyera o pojemności 500 ml, zaszczenia zarodnikami, umieszcza na trzęsawce obrotowej o 180 obrotach na minutę, o skoku 3–5 cm i inkubuje w temperaturze 28°C najczęściej przez 24 godziny.

Często stosuje się w tym etapie dwa przesiewy z podłoża bardziej uboższego na podłoże zawierające więcej źródła węgla.

Podłoże 3

Glukoza	10 g
Chlorek kobaltowy	0,0005 g
Węglan wapniowy	4 g
Wyciąg z ziemniaków	1000 ml
Olej sojowy	5 ml
pH naturalne	

Podłoże 4

Wyciąg namokowy kukurydzy	5 g
Mielone wytloki arachidowe	10 g
Mąka ziemniaczana	25 g
Siarczan amonowy	4 g
Chlorek sodowy	5 g
Węglan wapniowy	5 g
Woda destylowana	1000 ml
pH 5,7–5,8	

Podłoże 5

Wyciąg namokowy kukurydzy	7 g
Wytloki arachidowe	20 g
Mąka ziemniaczana	45 g
Siarczan amonowy	4 g
Węglan wapniowy	7 g
Siarczan kobaltowy	0,02 g
Woda destylowana	1000 ml
pH 6,0–6,2	

II etap cyklu hodowlanego szczepu *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. trwa również od 24 do 48 godzin, w zależności od warunków fermentacyjnych. W tanku fermentacyjnym 1000-litrowym zawierającym około 600 l odpowiedniego podłoża, w temperaturze 28°C, czas hodowli wynosi około 30 godzin. Podłoże składa się z mieszaniny odpowiednich ilości wyciągu namokowego kukurydzy, siarczanu amonowego, mąki ziemniaczanej, chlorku sodowego, węglanu wapniowego i oleju arachidowego (jako środka przeciw pienieniu się podłoża). Objętość inoculumu wegetatywnego pochodzącego z I etapu hodowli na trzęsawce wynosi powyżej 0,05% (od 0,1 do 1%) całkowitej objętości pożywki posiewowej tanku 1000 l. Warunki napowietrzania hodowli: 0,2–0,6 objętości powietrza na 1 objętość pożywki na minutę. Liczba obrotów mieszadła powinna od 200–360 na minutę.

Podłoże 6

Mąka z orzeszków ziemnych	20 g
Wyciąg namokowy kukurydzy	4 g
Wyciąg słodowy	2 g
Siarczan amonowy	2 g
Chlorek sodowy	4 g

Węglan wapniowy	10 g
Olej sojowy	5 ml
pH naturalne	

III etap cyklu hodowli szczepu *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. będący właściwą fermentacją, podczas której szczep ten wytwarza oksytetracyklinę, trwa w zależności od warunków hodowli 140—150 godzin. W tanku fermentacyjnym o objętości 15.000 l, zawierającym 10.000 l pożywki złożonej z mąki arachidowej, wyciągu namokowego kukurydzy, siarczanu amonowego, mąki ziemniaczanej, soli kobaltu, węglanu wapniowego i oleju arachidowego (jako środka zapobiegającego pienieniu się pożywki) czas fermentacji wynosi 144 godziny, w temperaturze 28°C, przy napowietrzaniu hodowli wynoszącym 0,6—0,8 objętości powietrza na 1 objętość pożywki na 1 minutę. W tym czasie stwierdza się maksymalne nagromadzenie oksytetracykliny w podłożu.

Podłoże 7

Wyciąg namokowy kukurydzy (50%)	5 g
Mąka ziemniaczana	37,5 g
Siarczan amonowy	6 g
Chlorek sodowy	5 g
Woda wodociągowa	1000 ml
Olej sojowy	2 g
pH 6,0—6,2	

Wydajność podłoża po 168 godzinach fermentacji przy zastosowaniu szczepu *Actinomyces varsoviensis* sp. nov.: 282 j w 1 ml; pH 7,1.

Podłoże 8

Mąka z orzeszków ziemnych	20 g
Wyciąg namokowy kukurydzy (50%)	4 g
Siarczan sodowy	2 g
Wyciąg słodowy	2 g
Chlorek sodowy	4 g
Węglan wapniowy	10 g
Olej sojowy	10 g
Woda wodociągowa	1000 ml
pH naturalne	

Podłoże 9

Mielone wytloki arachidowe	22,5 g
Wyciąg namokowy kukurydzy	6,3 g
Mąka ziemniaczana	40,0 g
Siarczan amonowy	3,6 g
Siarczan kobaltowy	0,018 g
Olej arachidowy	1,8 g
Węglan wapniowy	6,3 g
Woda wodociągowa	1000 ml
pH 6,3—6,5	

W 48 i 60 godzinie fermentacji dodaje się po 2,5 g oleju sojowego. W podłożu 8-ym olej sojowy jest podobnie, jak wyciąg słodowy, źródłem węgla.

Wydajność podłoża po 120 godzinach fermentacji w kolbach na trzęsawce przy zastosowaniu *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. wynosi 320 j w 1 ml przy pH—6,8 dla podłoża 8-ego oraz 365 j w 1 ml przy pH 6,9 dla podłoża 9.

Przy trójetapowej hodowli *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. prowadzącej w III etapie do biosyntezy oksytetracykliny, dwa pierwsze etapy służą do przygotowania odpowiedniej objętości właściwego pod względem jakościowym inoculum do posiewu pożywki etapu III, tj. do posiewu właściwego podłoża fermentacyjnego.

We wszystkich etapach hodowli inoculum jest kontrolowane za pomocą odpowiednich metod cytochemicznych (m. in. barwienie metodą Grama—w preparatach zabarwionych tą metodą inoculum posiewowe powinno być w 90% Gram—dodatnie). Ważną rolę odgrywa również kontrola i utrzymywanie odpowiedniego pH hodowli w poszczególnych etapach hodowli, zwłaszcza pH posiewanego inoculum i pH w czasie właściwej fermentacji. W etapie III to jest w okresie właściwej fermentacji, w czasie której *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. wytwarza oksytetracyklinę, pH pożywki powinno się utrzymywać w następujących granicach: przed zaszczepieniem za pomocą inoculum posiewowego, pochodzącego z tanku 1000 litrowego pH pożywki powinno leżeć w granicach 6,2—6,9, w czasie fermentacji może wzrosnąć do 6,8—8,8 i w końcu fermentacji powinno się mieścić w granicach wartości wyjściowych 6,2—6,9.

Za pomocą chromatografii bibułowej w układach rozwijających octan etylowy nasycony wodą oraz octan butylowy—keton metyloizobutyloowy-n-butanol w stosunku 5:15:2, stwierdzono w brzeczkiach fermentacyjnych szczepu *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. obecność tylko jednej substancji przeciwbakteryjnej, przy biologicznym wywołaniu chromatogramu za pomocą *Bacillus subtilis* 6633. Położenie tej substancji na pasku bibuły odpowiadało położeniu strefy zahamowania, wywołanej przez oksytetracyklinę.

Po zakończeniu fermentacji brzeczki przez *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. oksytetracyklinę można wydzielić z cieczy fermentacyjnej różnymi znanymi sposobami.

W celu oddzielenia grzybni zakwasza się brzeczkę fermentacyjną do pH 1,5—2,0, najlepiej do pH 1,8 kwasem szczawiovym przy ciągłym mie-

szaniu. W tych granicach pH następuje rozkład powstałych w czasie fermentacji kompleksowych soli oksytetracykliny z wapniem i magnezem i całkowite przejście antybiotyku do roztworu. W tych warunkach zachodzi również częściowe strącenie substancji białkowych i innych zanieczyszczeń zawartych w brzeczce, co z kolei ułatwia sączenie i powoduje otrzymanie przejrzystego przesączu. Po zakwaszeniu brzeczki dodaje się około 6% ziemi okrzemkowej, jako środka ułatwiającego sączenie, całość energicznie miesza się przez 30 minut, po czym grzybnię odcąsza się razem z wytrąconym szczawianem wapnia.

Z przejrzystego przesączu antybiotyk można wydzielić jedną z ogólnie znanych metod izolacji i oczyszczania antybiotyków.

Oksytetracyklina, jako związek amfoteryczny mający w swej strukturze grupy kwasowe i zasadowe, posiadający stałe dysocjacji równe pK 3,5; 7,6; 9,2; wykazuje zdolność adsorpcji na wymienniczych jonowych.

Jako wymienniczą jonową można zastosować kationit CBC-3 o średnicy ziarna od 0,2 do 0,5 mm, którym wypełnia się kolumnę do wysokości 20 cm. Stosunek średnicy kolumny do jej wysokości wynosi 1:10. Szybkość przepływu przesączu brzeczki przez kolumnę jonitową wynosi 200 ml/cm²/godz. Wydajność adsorpcji antybiotyku na wymienniczych jonowych zależy w dużej mierze od stężenia oksytetracyklin w brzeczce fermentacyjnej i waha się od 200 do 1000 mg na gram wymiennicza.

Po ukończonej adsorpcji kolumnę jonitową z zaadsorbowanym antybiotykiem przemywa się kolejno wodą destylowaną i metanolem i następnie eluuje się zaadsorbowaną oksytetracyklinę metanolem nasyconym HCl . Szybkość przepływu kwaśnego metanolu wynosi 30 ml/cm²/godz.

Wydajność procesu eluacji zależy od stężenia zaadsorbowanego antybiotyku na wymienniczych jonowych i wynosi 50—97%.

Kontrolę przebiegu procesu adsorpcji i eluacji prowadzi się pobierając próbki z poszczególnych frakcji i oznaczając w nich zawartość antybiotyku ogólnie znanymi metodami chemicznymi i biologicznymi.

Kwaśny eluat metanolowy zawierający zaadsorbowany antybiotyk można zobojętnić roztworem $NaOH$, ale sposób ten powoduje dodatkowe wprowadzenie soli nieorganicznych do roztworu, co utrudnia oczyszczanie antybiotyku.

Lepiej zastosować do zobojętniania kwaśnego eluatu anionit, np. AH-2 lub EOE-10 o charakterze zasadowym. Zobojętnienie na anionicie

przebiega z zaadsorbowaniem z roztworu jonów chlorowych i z wydzielaniem się wody. Zobojętnienie prowadzi się tak, aby metanolowy roztwór antybiotyku osiągnął $pH = 3,0—3,5$.

W czasie zobojętniania straty antybiotyku dochodzą do 7%. Zobojętniony eluat zagęszcza się w wyparce próżniowej w temperaturze 35—40°C do niewielkiej objętości i następnie wytrąca chlorowodorek oksytetracykliny stężonym kwasem solnym. Wytrącony osad po przesączeniu i przemyciu kolejno metanolem i acetonem suszy się w temperaturze 40°C. Chlorowodorek oksytetracykliny otrzymuje się z wydajnością około 36%. Moc otrzymanego chlorowodoru oksytetracykliny wynosi około 670 mcg/mg.

W celu uzyskania produktu o wyższej mocy można go przekrystalizować ogólnie znanymi metodami (patrz przykład IV).

Przykład I. 10 l brzeczki fermentacyjnej *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. zakwasza się kwasem szczawiovym do pH 2,0 stale mieszając. Następnie dodaje się 500 g ziemi okrzemkowej i miesza całość przez 30 minut, po czym brzeczkę oddziela się na wirówce. W przypadku mętnego przesączu, sączenie należy powtórzyć.

Klarowny przesącz o $pH = 2,0—2,5$ przepuszcza się przez kolumnę wypełnioną kationitem CBC-3 z szybkością 200 ml/cm²/godz. Po przepuszczeniu brzeczki, kolumnę przemywa się 500 ml wody destylowanej i następnie 250 ml metanolu. Zaadsorbowany antybiotyk na kationicie aluuje się 1500 ml 1 n roztworem HCl w metanolu z szybkością przepływu 30 ml/cm²/godz.

Zebrany eluat oksytetracykliny zawiera 2,19 g oksytetracykliny tj. 49% pierwotnej ilości.

Kwaśny eluat zobojętnia się za pomocą anionitu do pH 3,0—3,5 i następnie zagęszcza w wyparce próżniowej w temperaturze 35—40°C do objętości 50 ml.

Metanolowy koncentrat oksytetracykliny zadaje się stężonym kwasem solnym, przy czym następuje wysalanie chlorowodoru oksytetracykliny. Odsączony osad przemywa się kolejno metanolem i eterem i następnie suszy w temperaturze 40°C.

Otrzymano 1,6 g oksytetracykliny o mocy 670 mcg/mg.

Inny sposób izolacji oksytetracykliny z brzeczki fermentacyjnej *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. polega na ekstrakcji antybiotyku z fazy wodnej organicznym rozpuszczalnikiem nie mieszającym się z wodą przy odpowiednim pH , dostosowanym do użytego rozpuszczalnika. Jako roz-

puszczalniki mogą być stosowane alkohole: butylowy, amylowy i ich estry oraz mieszaniny alkoholi i ich estrów z niskimi kwasami organicznymi. Klarowną brzeczkę fermentacyjną zadaje się wśród ciągłego mieszania mieszaniną butanolu i octanu butylowego i następnie dodaje się 20% roztworu NaOH , w celu doprowadzenia do $\text{pH} = 9,5$. W tych warunkach oksytetracyklina przechodzi z fazy wodnej do fazy organicznej. Po rozdzieleniu faz, fazę organiczną zawierającą wyekstrahowany antybiotyk zadaje się roztworem kwasu siarkowego doprowadzając pH do 2,0. Antybiotyk przechodzi do fazy wodnej, z której po oddzieleniu fazy organicznej wysala się chlorowodorek oksytetracykliny solą kuchenną przy pH 5,5. Wytrącony osad chlorowodoru oksytetracykliny po odsączeniu przemywa się metanolem, a następnie eterem.

Przykład II. 10 l breczki fermentacyjnej *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. zakwasza się kwasem szczawiowym do pH 1,8 stale mieszając. Następnie dodaje się 500 g ziemi okrzemkowej i miesza całość w ciągu pół godziny, po czym odsąca się grzybnie i wytrącony szczawian wapniowy. W przypadku otrzymania mętnego lub opalizującego przesączu należy proces sączenia powtórzyć.

Przejrzysty przesącz o $\text{pH} = 1,8$ zadaje się 1000 ml mieszaniny butanolu i octanu butylowego w stosunku 93:7 i przy stałym mieszaniiu dodaje do niego w sposób ciągły 20%-owy roztwór NaOH doprowadzając środowisko do $\text{pH} = 9,5$. Po ustaleniu pH całość miesza się w ciągu 1 godziny i następnie pozostawia do rozdzielenia się faz.

Wydajność z breczki do fazy organicznej wynosi 85%.

Oddzieloną fazę organiczną od fazy wodnej ekstrahuje się 0,1 n H_2SO_4 przy stałym mieszaniiu i doprowadza się do $\text{pH} = 1,8$. Po ustaleniu pH całość miesza się w ciągu 1 godziny i następnie pozostawia do rozdzielenia faz. Fazę wodną zadaje się krystalicznym NaCl , doprowadza do $\text{pH} = 5,5$ i pozostawia do wykrystalizowania chlorowodoru oksytetracykliny. Osad odsąca się, przemywa alkoholem, a następnie eterem i suszy w temperaturze 40°C .

Moc otrzymanego chlorowodoru oksytetracykliny wynosi 640 mcg w 1 mg. Wydajność procesu wynosi 46%.

Inny sposób wydzielenia oksytetracykliny z breczki pofermentacyjnej polega na wysoleniu antybiotyku solą kuchenną z alkalicznego środowiska. Niewielki dodatek butanolu do przesączu

powoduje zwiększenie czystości wytrąconej oksytetracykliny.

Odsączony osad po przemyciu i wysuszeniu rozpuszcza się w metanолоwym roztworze chloru wapniowego, z którego wytrąca się osad chlorowodoru oksytetracykliny stężonym kwasem solnym. Odsączony osad przemywa się kolejno metanolem i eterem, a następnie suszy w temperaturze 40°C .

Przykład III. 10 l breczki fermentacyjnej *Actinomyces varsoviensis* sp. nov. zakwasza się kwasem szczawiowym do $\text{pH} = 1,8$. Następnie dodaje się 500 g ziemi okrzemkowej i miesza całość w ciągu 30 minut, po czym brzeczkę odsąca się na wirówce. W wypadku otrzymania mętnego przesączu, proces sączenia powtarza się aż do uzyskania przejrzystego przesączu.

Do przesączonej breczki dodaje się przy stałym mieszaniiu 2,5 kg soli kuchennej i 500 ml butanolu, a następnie alkalizuje się roztworem NaOH do $\text{pH} = 9,0-9,5$.

Całość miesza się w ciągu 1 godziny, a następnie pozostawia do rozdzielenia się faz. W fazie pośredniej na granicy fazy wodnej i organicznej zawieszony jest osad kompleksowych soli oksytetracykliny. Po oddzieleniu fazy wodnej, fazę organiczną wraz z fazą pośrednią zadaje się ziemią okrzemkową i po wymieszaniiu odsąca się osad kompleksowych soli oksytetracykliny i ziemi okrzemkowej.

Po przemyciu i wysuszeniu w temperaturze 40°C otrzymano 27 g osadu kompleksowej soli antybiotyku o mocy 115 mcg w 1 mg, co stanowi 72% pierwotnej ilości antybiotyku. Uzyskany osad ekstrahuje się pięciokrotnie w 80 ml metanолоwego roztworu chloru wapniowego, stosując do pierwszej ekstrakcji 30 ml, do drugiej i trzeciej po 15 ml, do czwartej i piątej po 10 ml.

Do zebranego przesączu metanолоwego w ilości 58 ml wkrapla się 6 ml stężonego kwasu solnego przy stałym mieszaniiu. W tych warunkach wytrącają się kryształy chlorowodoru oksytetracykliny, które po odsączeniu i przemyciu 99% metanolem suszy się w temperaturze 40°C .

Uzyskano 1,78 g chlorowodoru oksytetracykliny o mocy 860 mcg w 1 mg.

Przykład IV. Sposób rekrytalizacji oksytetracykliny. Celem otrzymania chlorowodoru oksytetracykliny o wysokiej mocy można przeprowadzić rekrytalizację preparatu z metanолоwego roztworu chloru wapniowego i trójetyloaminy: 3,5 g chlorowodoru oksytetracykliny o mocy 670 j w 1 mg zadaje się 1,2 g trójetylo-

aminy i 30 ml metanolowego roztworu chlorku wapniowego. Po całkowitym rozpuszczeniu chlorowodoru oksytetracykliny dodaje się 4,5 ml stężonego kwasu solnego. Wytrąca się osad chlorowodoru oksytetracykliny, który po odsączeniu i kolejnym przemyciu metanolem i eterem suszy się w temperaturze 40°C.

Otrzymano 2,6 g chlorowodoru oksytetracykliny o mocy 920 mcg w 1 mg.

Kontrolę przeprowadzono ogólnie znanymi metodami chemicznymi i biologicznymi.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania oksytetracykliny na drodze biosyntezy w warunkach tlenowych w płynnym podłożu zawierającym źródła azotu, węgla, soli mineralnych i elementów śladowych, znamienny tym, że do biosyntezy stosuje się szczep *Actinomyces varsoviensis* sp. nov., będący nowym gatunkiem promieniowca.

Włodzimierz Kuryłowicz
Franciszek Ulak

Zastępcy: Józef Felkner & Wanda Modlibowska
rzecznicy patentowi