

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 05.06.1965 (P. 126 308)

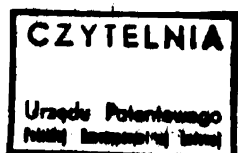
Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 30.11.1972

Opis patentowy opublikowano: 04.06.1974

Kl. 30h,6

MKP C12d 9/22

Uprawniony z patentu: Biochemie Kundl Gesellschaft m.b.H., Kundl
(Austria)

Sposób wytwarzania pleuromutiliny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania pleuromutiliny.

Otrzymana sposobem według wynalazku pleuromutilina o wzorze 1 jest już znana i została otrzymana w sposób opisany w publikacji w Proc. Nat. Acat. Sci., strona 570 (1951). Według tego sposobu hoduje się drobnoustrój *Pleurotus mutilus* w temperaturze 25°C, w 2800 ml roztworu pożywki „corn steep”, zawierającej w 1 litrze każdorazowo 1,5 g KH_2PO_4 , 0,5 g KCl , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g NaNO_3 , 40 g dekstrozy i 5 g pożywki specjalnej Staley'a, w butli Fernbach'a. Po upływie około 4 tygodni po zaszczepieniu grzybnia pokrywa powierzchnię cieczy.

Według odmiany powyższego sposobu hodowlę *Pleurotus mutilus* zaszczepia się na wstrząsarce kołowej w temperaturze 25°C w 200 ml wyżej podanego roztworu pożywki w kolbie Erlenmeyer'a o pojemności 500 ml.

Otrzymaną w powyższy sposób ciecz hodowlaną ekstrahuje się chloroformem przy wartości $\text{pH} = 5,3$, to znaczy przy naturalnej wartości pH roztworu pożywki.

Stosunek ilości roztworu pożywki do ilości chloroformu wynosi 10 : 1. Po zateżeniu warstwy chloroformowej w niskiej temperaturze otrzymuje się brunatną masę o konsystencji gumy. Pozostałość rozpuszcza się w eterze i ekstrahuje roztwór eterowy jednokrotnie za pomocą około 0,05 objętości ln roztworu wodorotlenku sodu w celu usunięcia

2

substancji kwaśnych, a następnie przemywa kilkakrotnie wodą i wreszcie rozcieńczonym kwasem. Eter odciąga się w temperaturze pokojowej i brunatną masę o konsystencji gumy pozostawia się do wykrystalizowania.

Kryształy miesza się z eterem, następnie sączy i przemywa niewielką ilością eteru. Z przesączu otrzymuje się dalszą ilość krystalizatu. Brunatne kryształy rozpuszcza się w niewielkiej ilości etanolu, następnie roztwór traktuje się eterem i węglem aktywowanym, a w końcu sączy. Otrzymany roztwór zateża się w temperaturze pokojowej, otrzymaną przy tym szklistą masę rozpuszcza się w możliwie małej ilości wrzącego etanolu i zadaje eterem. Otrzymane przy tym kryształy odsąca się, przemywa eterem i wysusza w powietrzu. Z 1 litra cieczy hodowlanej otrzymuje się w ten sposób 50 mg krystalicznej pleuromutiliny (Proc. Nat. Acad. Sci., str. 572, w. 3/4, 1951).

Związek ten jest łatwo rozpuszczalny w alkoholu, eterze, octanie butylu, acetonie, metyloizobutyloketonie, czteroglikolu i chloroformie, natomiast trudno rozpuszczalny w wodzie, eterze naftowym i cykloheksanie. Jego temperatura topnienia wynosi 167°C (po wykrystalizowaniu z mieszaniny $\text{H}_2\text{O} : \text{C}_2\text{H}_5\text{OH} = 1 : 4$), skręcalność optyczna $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +32^\circ$ (10% roztwór w chloroformie), charakterystyczne maksima w widmie ultrafioletowym przy długości fal 205 i 293 m μ (w eterze) lub 209 i 290 m μ (w 60%-wym etanolu) oraz charakterystyczne

pasma adsorpcji w widmie podczerwonym przy częstotliwościach 3400, 3000, 1235 i 1095 cm^{-1} (w pastylkach z bromku potasowego) i przy 3570, 3610, 1730, 1740 i 1630 cm^{-1} (w roztworze w chlorku metylenu).

Analogicznie, jak w sposobach wyżej opisanych poddaje się hodowli mikroorganizmy *Pleurotus passeckerianus* Pilat, jak również *Drosophila subrata*. Pierwszy z tych mikroorganizmów daje żądaną pleuromutilinę z wydajnością znacznie poniżej 50 mg na liter cieczy hodowlanej (Proc. Nat. Acad. Sci., str. 1, w. 5—7 od dołu, 1951). Stosując drugi z wymienionych mikroorganizmów, otrzymuje się również tylko niewielkie ilości pleuromutiliny.

(*Drosophilin B*), wraz z domieszką składnika *Drosophilin A*, C i D.

Zaletą sposobu według wynalazku polega na tym, że przy jego pomocy uzyskuje się pleuromutilinę z bardzo dużą, w porównaniu ze znanym sposobem, wydajnością, która pozwala na techniczne zastosowanie tego związku.

Sposobem według wynalazku przy zastosowaniu drobnoustroju *Clitopilus passeckerianus* (Pil.) Sing. NRRL 3100 otrzymuje się 2390 mg surowego produktu na 1 liter cieczy hodowlanej i odpowiednio 1960 mg 100%-wej substancji czystej, a w przypadku zastosowania jego mutantu NRRL 3279 wydajność wynosi 3630 mg surowego produktu na 1 liter cieczy hodowlanej i odpowiednio 3160 mg 100%-wej substancji czystej.

Sposobem według wynalazku można uzyskać pleuromutilinę, hodując drobnoustrój *Clitopilus passeckerianus* (Pil.) Sing. NRRL 3100, albo jego mutant NRRL 3279, w wodnym roztworze pożywki, zawierającej źródło azotu i węglowodanów.

Korzystna forma przeprowadzenia powyższego sposobu hodowania polega na tym, że wyżej wymieniony drobnoustrój NRRL 3 100 lub jego mutant NRRL 3279 hodzi się najpierw w kulturze wstępnej, zawierającej jako źródło węglowodanów i azotu ekstrakt słodowy, a ponadto mąkę fasolową, ekstrakt drożdżowy, agar, pepton oraz sole mineralne, a otrzymaną przy tym brzeczkę fermentacyjną przenosi się następnie w celu dalszego hodowania do roztworu fermentacyjnego, zawierającego jako źródło węglowodanu glukozę, a jako źródło azotu autolizat drożdży piwnych, jak również sole mineralne. Po zakończeniu hodowli wytworzoną przy tym pleuromutilinę wyodrębnia się w znany sposób.

Stosowany sposobem według wynalazku drobnoustrój *Clitopilus passeckerianus* (Pil.) Sing. NRRL 3 100 należy do rodziny Tricholomataceae, rzędu Agaricales, klasy Basidiomycetes.

Grzybek podstawczak *Clitopilus passeckerianus*, NRRL 3 100 rośnie bardzo bujnie na dekstrozo-agarowej pożywce Sabourad'a (produkcji Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA), jego kolonie osiągają po 10 dniach hodowli w temperaturze 25°C przeciętną średnicę 49 mm. Barwa wierzchniej strony kolonii jest blado-śmietankowa z białymi wycinkami. Barwa spodniej strony kolonii jest śnieżno-biała z rozjaśnionymi wycinkami. Podłoże pod kolonią nie zmienia barwy własnej. Struktura powierzchni kolonii: w centrum umiar-

kowanie podwyższony, waciasto-puszysty, biały wierzchołek o średnicy 4—5 mm. Z niego promieniście wybiegające, ciasno przy sobie leżące pasma nitek grzybni, które w wycinkach białych ułożone są bardzo ściśle. Brzeg kolonii jest postrzępiony. Obraz mikroskopowy: nitki grzybni o średnicy 2—3 mikronów, nie tworzące klamr, nie tworzące zarodników.

Grzybek ten rośnie bardzo bujnie na pożywce z autolizatu drożdży piwnych, dekstrozy i agaru o następującym składzie: 1,0 g N z przesączonego autolizatu drożdży piwnych, 50,0 g glikozy, 1,0 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{Ca/NO}_3/2$, 0,1 g NaCl , 0,05 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20,0 g bacto-agaru (firmy Difco), dopełnionej do 1000 ml wodą źródlaną, pH = 6 nastawione za pomocą NaOH. Kolonie osiągają po 10 dniach hodowli w temperaturze 25°C przeciętną średnicę 60 mm. Barwa wierzchniej strony kolonii jest biała. Spodnia strona kolonii ma barwę jasnego żółtka jaja. Podłoże pod kolonią nie zmienia barwy własnej.

Struktura powierzchni kolonii: wierzchołek centralny o średnicy 3—5 mm, wysokości 1—2 mm, z bardzo zbitej waciastej grzybni. Z niego 12—14, przeważnie 15—20 mm długich, wybiegających promienistych bruzd. Kolonie wykazują poza obszarem wierzchołka puszystą grzybnę z promieniście skierowanymi pasmami nitek grzybni. Część brzegowa kolonii o szerokości 3 mm składa się z luźno ułożonych nitek grzybni i pozwala przeświecać podłoże. Brzeg jest słabo postrzępiony. Obraz mikroskopowy: nitki grzybni o średnicy 2,0—3,5 mikronów, bez klamr, nie tworzące zarodników.

Grzybek rośnie nadzwyczaj słabo na roztworze agarowym Czapek'a (produkcji Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA). Bardzo rzadka grzybnia z wyjątkiem części centralnej kolonii daje się dobrze rozpoznać pod mikroskopem tylko w świetle przechodzącym. Kolonie osiągają po 10 dniach hodowli w temperaturze 25°C przeciętną średnicę 78 mm. Barwa wierzchniej i spodniej strony kolonii jest w części centralnej biała, poza tym prawie szklista. Podłoże pod kolonią nie zmienia barwy własnej. Struktura powierzchni kolonii: część centralna o średnicy 7 mm składająca się z gęstszych pasm nitek grzybni, poza tym bardzo luźno obok siebie leżące, promieniście wybiegające i bardzo słabo rozgałęzione nitki grzybni. Brzeg kolonii jest silnie postrzępiony. Obraz mikroskopowy: nitki grzybni o średnicy 1,5 — 3,0 mikronów, nie tworzące klamr, nie tworzące zarodników.

Grzybek rośnie słabo na agarze słodowym (produkcji Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) i osiąga po 10 dniach hodowli w temperaturze 25°C przeciętną średnicę 74 mm. Barwa wierzchniej i spodniej strony kolonii jest prawie szklista. Podłoże pod kolonią nie zmienia barwy własnej. Struktura powierzchni kolonii: część centralna o średnicy 5 — 7 mm, lekko wzniesiona i składająca się z grubszych pasm nitek grzybni. Pozostała powierzchnia płaska, o bardzo delikatnych, lecz gęsto obok siebie leżących, promieniście wybiegających pasmach nitek grzybni. Brzeg kolonii jest postrzępiony. Obraz mikroskopowy: nitki grzybni

o średnicy 1,5 — 4,5 mikrona, nie tworzące klamr, nie tworzące zarodników.

Mutant grzybka podstawczaka *Clitopilus passeckerianus*, NRRL 3279 rośnie bardzo bujnie na dekstrozo-agarowej pożywce Sabouraud'a (produkcji Difco Laboratories, Detroit, Mich. USA), jego kolonie osiągają po 10 dniach hodowli w temperaturze 25°C przeciętną średnicę 35 mm. Barwa wierzchniej strony kolonii jest mleczno-biała.

Barwa spodniej strony kolonii jest jasnośmietankowa, w centrum ochrowo-żółta. Podłoże pod kolonią nie zmienia barwy własnej. Struktura powierzchni kolonii: w centrum umiarkowanie podwyższony, stożkowaty, aksamitny, biały wierzchołek o średnicy 2 — 3 mm. Od niego promieniście wybiegające, ściśle ułożone pasma nitek grzybni. Brzeg kolonii jest słabo postrzępiony. Obraz mikroskopowy: nitki grzybni o średnicy 1,5 — 3,5 mikrona, nie tworzące klamr, nie tworzące zarodników.

Grzybek rośnie bardzo bujnie na pożywce z autolizatu drożdży piwnych, dekstrozy i agaru o następującym składzie: 1,0 g N przesączonego autolizatu drożdży piwnych, 50,0 g glikozy, 1,0 g KH_2PO_4 , 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{Ca/NO}_3/2$, 0,1 g Na Cl, 0,05 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20,0 g bacto-agaru (firmy Difco) dopełnionej do 1000 ml wodą źródłaną, pH = 6,0 nastawione za pomocą NaOH. Kolonie osiągają po 10 dniach hodowli w temperaturze 25°C przeciętną średnicę 23 mm. Barwa wierzchniej strony kolonii jest śnieżno-biała. Barwa spodniej strony kolonii jest jasno-śmietankowa. Podłoże pod kolonią nie zmienia barwy własnej. Struktura powierzchni kolonii: cała powierzchnia składa się ze zbitej, aksamitnej grzybni. Centralny, słabo podwyższony, stożkowaty wierzchołek o średnicy 2 — 3 mm. Z niego wybiegających 7 — 8, przeważnie 5 — 7 mm długich, dobrze uwydatnionych promienistych bruzd. Brzeg kolonii jest słabo postrzępiony. Obraz mikroskopowy: nitki grzybni o średnicy 1,5 — 3,0 mikronów, bez klamr, nie tworzące zarodników.

Grzybek rośnie bardzo słabo na roztworze agarowym Czapek'a (firmy Difco Laboratories, Detroit Mich., USA). Bardzo rzadka grzybnia z wyjątkiem centralnej części kolonii daje się dobrze rozpoznać makroskopowo tylko w świetle przechodzącym. Kolonie osiągają po 10 dniach hodowli w temperaturze 25°C przeciętną średnicę 33 mm. Barwa wierzchniej i spodniej strony kolonii w części środkowej blado-biała, poza tym szklista. Podłoże pod kolonią nie zmienia barwy własnej. Struktura powierzchni kolonii: część centralna o średnicy 2 — 4 mm składająca się z nieco gęstszych pasm nitek grzybni, poza tym bardzo luźno obok siebie leżące, wybiegające promieniście pasma nitek grzybni. Brzeg kolonii jest silnie postrzępiony. Obraz mikroskopowy: nitki grzybni o średnicy 2 — 4 mikronów, bez klamr, nie tworzące zarodników.

Grzybek rośnie słabo na agarze słodowym (firmy Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) i osiąga po 10 dniach hodowli w temperaturze 25°C przeciętną średnicę kolonii 37 mm. Barwa wierzchniej i spodniej strony kolonii jest prawie szklista. Podłoże pod kolonią nie zmienia barwy własnej.

Struktura powierzchni kolonii: część centralna o średnicy 2 — 3 mm, lekko wzniesiona i składająca się z grubszych pasm nitek grzybni. Pozostała powierzchnia płaska, z delikatnymi, lecz ściśle ułożonymi, promieniście wybiegającymi pasmami nitek grzybni, które błyszczą jedwabieście w świetle przechodzącym. Brzeg kolonii jest słabo postrzępiony. Obraz mikroskopowy: nitki grzybni o średnicy 1,5 — 4,0 mikronów, nie tworzące zarodników.

Pleuromutilina, otrzymana sposobem według wynalazku, stanowi znakomity dodatek do gotowych mieszanek paszowych. Ponieważ w stosowanych zwykle ilościach, wskutek niewielkiego wchłaniania w organizmie ludzkim, jest ona nieskuteczna przeciwko zarazkom chorobotwórczym u człowieka, wytworzone przy użyciu tego związku gotowe mieszanki paszowe nie mogą prowadzić do rozwoju odpornych kultur bakterii, jak to ma zazwyczaj miejsce w przypadku antybiotyków, stosowanych u ludzi, które stanowią również znane dodatki paszowe.

Dalsza zaleta pleuromutiliny polega na tym, że nie jest ona atakowana przez pozostałe składniki gotowej mieszanki paszowej, jak np. suche grzybnie, w szczególności z produkcji penicyliny, mączki z krwi i/lub substancje mineralne i/lub witaminy, w szczególności jednak przez koncentraty białkowe, np. mączki rybne. Ponieważ pleuromutilina jest w wodzie trudno rozpuszczalna, bardzo duże jej ilości po hodowaniu znajdują się w grzybniach, tak że jest możliwe już przez wysuszenie i następne zmielenie grzybni uzyskanie bardzo skutecznego dodatku do pasz suchych.

Zawartość pleuromutiliny w 1 kg gotowej mieszanki paszowej powinna wynosić 2,5 — 50 mg dla drobiu i 10 — 50 mg dla świń. W przypadku cieląt i bydła tucznego gotowa mieszanka paszowa powinna być skarmiana w takiej ilości, aby dziennie przyjmowana dawka wynosiła 25 — 70 mg pleuromutiliny. Pleuromutilina wykazuje w większych dawkach korzystne działanie przeciwko zarazkom chorobotwórczym zwierząt, tak że możliwe jest stosowanie pleuromutiliny w weterynarii.

Poniższe przykłady stanowią ilustrację sposobu według wynalazku, nie ograniczając jednak jego zakresu.

Przykład I. Otrzymywanie pleuromutiliny. Kulturę *Clitopilus passeckerianus* NRRL 3100 na pożywce agarowej spłukuje się wyjałowionym fizjologicznym roztworem soli kuchennej i 3 ml otrzymanej zawiesiny przeszczepia do szerokoszyjnej kolby stożkowej o pojemności 500 ml napelnionej 60 ml wyjałowionego roztworu pożywki.

Pożywka do skosów agarowych: mąka fasolowa 10,0 g, KH_2PO_4 0,5 g, FeCl (1% roztwór) 1,0 ml, ekstrakt drożdżowy 0,1 g, ekstrakt słodowy 50,0 g, pepton 1,0 g i agar 15,0 g, woda destylowana do 1000 ml, przy naturalnym pH.

Roztwór pożywki do fermentacji: glukoza 50,0 g/l, N-autolizat drożdży piwnych 1,0 g/l, KH_2PO_4 1,0 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l, $\text{Ca/NO}_3/2$ 0,5 g/l, NaCl 0,1 g/l i $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g/l, woda destylowana do 1000 ml; pH przed wyjałowieniem 6,0.

Po 120 godzinach fermentacji w temperaturze 24°C na wytrząsarce obrotowej o skoku 40 mm

i 250 obrotach na minutę, zawartość szerokoszyjnej kolby stożkowej o pojemności 500 ml nabiera konsystencji gęstej brei. Z niej 10 ml stosuje się do przeszczepienia do szerokoszyjnej kolby stożkowej o pojemności 2 litrów, napełnionej 200 ml wyżej podanego wyjałowionego roztworu pożywki do fermentacji. Hodowlę przeprowadza się w tych samych warunkach, jak przy przeprowadzaniu pierwszego etapu wstępnego. Po upływie 48 godzin uzyskaną brzeczkę fermentacyjną przeszczepia się do wypełnionego 10 l wyżej podanego roztworu pożywki do fermentacji naczynia typu New-Brunswick do fermentacji submersyjnej, wyposażonego w układ przeszkód. Fermentację prowadzi się w ciągu 120 godzin przy przepływie powietrza 0,5 l na 1 l roztworu pożywki na minutę i przy szybkości obrotowej mieszadła krążkowego 350 obrotów na minutę.

Wytwarzanie placka zawierającego pleuromutilinę do zastosowania jako dodatek do paszy. Całą zawartość naczynia fermentacyjnego odparowuje się do suchości w wyparce próżniowej w temperaturze pokojowej, a uzyskany placek miele się na drobny proszek. Otrzymuje się przy tym 200 g suchego proszku o zawartości 5 g pleuromutiliny.

Wyodrębnienie pleuromutiliny. Po zakończeniu fermentacji breję fermentacyjną rozdziela się przez sączenie na nuczy ciśnieniowej na 8,1 l przesączu kultury i grzybni.

Ekstrakcja pleuromutiliny z przesączu kultury. 8,1 l przesączu o pH = 6,8 ekstrahuje się dwukrotnie każdorazowo za pomocą 1,6 l octanu etylu. Cała substancja czynna przechodzi przy tym do fazy organicznej. Odwadnia się ją za pomocą bezwodnego Na_2SO_4 , zatęża maksymalnie pod zmniejszonym ciśnieniem i wreszcie zadaje 50 ml eteru dwuetylowego. Po 24-godzinym odstaniu w temperaturze $+3^\circ\text{C}$ wytrąca się pleuromutilina w postaci krystalicznej. Następnie odsąca się, przemywa dwukrotnie za pomocą 50 ml eteru naftowego o temperaturze wrzenia 60 — 80°C , po czym suszy się pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej. Uzyskana pleuromutilina ma stopień czystości 86,2%.

Ekstrakcja pleuromutiliny z grzybni.

Wilgotną grzybnię ekstrahuje się trzykrotnie za pomocą 3,4 l technicznego acetonu (o zawartości 9 % wody), wytrząsając silnie za każdym razem w ciągu 30 minut. Po połączeniu ekstraktów i odparowaniu acetonu pod zmniejszonym ciśnieniem pozostaje 2,0 l fazy wodnej, z której wytrąca się pleuromutilina. Zawiesinę ekstrahuje się teraz dwukrotnie każdorazowo za pomocą 0,5 l octanu etylu,

ekstrat przemywa się raz za pomocą 1 litra 5%-go roztworu wodnego węglanu sodowego, a następnie wodą do odczynu obojętnego. Po następnym odwodnieniu bezwodnym Na_2SO_4 i zatężeniu pod zmniejszonym ciśnieniem wytrąca się pleuromutilina w postaci krystalicznej. Zadaje się ją 100 ml eteru i pozostawia na 24 godziny w temperaturze $+3^\circ\text{C}$. Po odsączeniu i przemyciu wykrystalizowanej substancji za pomocą 200 ml eteru naftowego (temperatura wrzenia 60 — 80°C) otrzymuje się pleuromutilinę o stopniu czystości 81,0%.

Przykład II. Otrzymywanie pleuromutiliny przez hodowanie mutantu NRRL 3279. Przy zastosowaniu opisanego w przykładzie I sposobu fermentacji, jednak z zastąpieniem użytego w nim szczepu grzyba *Clitopilus passeckerianus* NRRL 3100 jego mutantem NRRL 3279, uzyskuje się zawierającą pleuromutilinę brzeczkę fermentacyjną, którą przerabia się w sposób niżej opisany:

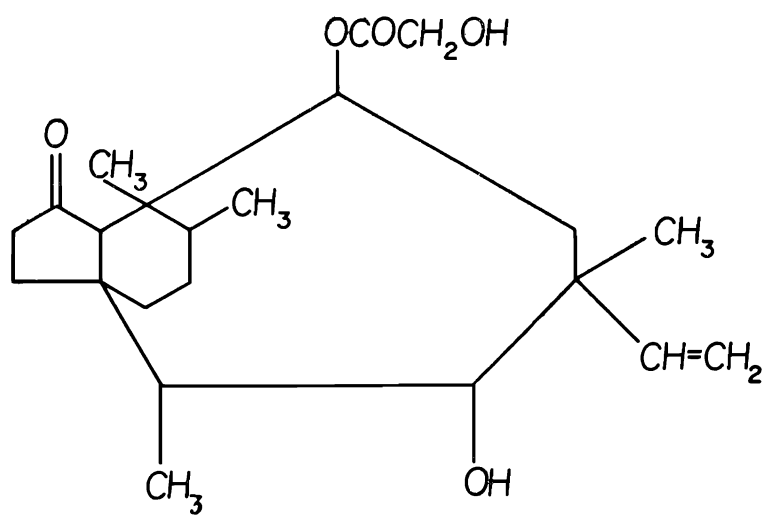
Ekstrakcja pleuromutiliny z przesączu kultury: 8,5 l przesączu o pH = 6,5 ekstrahuje się dwukrotnie każdorazowo za pomocą 1,7 l octanu etylu. Dalszą przeróbkę przeprowadza się, jak w przykładzie I. Otrzymana pleuromutilina ma stopień czystości 85,5%.

Ekstrakcja pleuromutiliny z grzybni. Wilgotną grzybnię ekstrahuje się trzykrotnie za pomocą 2,6 l technicznego acetonu (o zawartości 9% wody), silnie wytrząsając za każdym razem w ciągu 30 minut. Po połączeniu ekstraktów i odparowaniu acetonu pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymuje się 1,5 l fazy wodnej, z której wytrąca się antybiotyki. Dalszą przeróbkę przeprowadza się, jak w przykładzie I. Otrzymuje się przy tym pleuromutilinę o stopniu czystości 87,3%.

Otrzymywanie zawierającego pleuromutilinę placka przez odparowanie brei kultury po fermentacji lub oddzielonej od cieczy przez sączenie grzybni jest przy zastosowaniu szczepu NRRL 3279 szczególnie proste i racjonalne. Na skutek wysokiej zawartości pleuromutiliny w grzybni można w ten sposób uzyskać przedmieszkę do przyrządzania gotowej paszy, która zawiera 5% suchej substancji środka czynnego.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania pleuromutiliny, znamienny tym, że hoduje się drobnoustrój NRRL 3100 *Clitopilus passeckerianus* (Pil.) Sing. lub jego mutant NRRL 3279 w wodnym roztworze pożywki, zawierającej źródło azotu i węglowodanów.



Wzór 1