



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 01.10.76 (P. 192795)

Pierwszeństwo: 02.10.75 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 18.07.77

Opis patentowy opublikowano: 16.07.1979

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Int. Cl.² C12D 9/04

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Eli Lilly and Company, Indianapolis, Indiana
(Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku A-22082

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowego antybiotyku A-22082, który jest antybiotykiem polipeptydowym. Sposób według wynalazku obejmuje również oddzielanie i wyodrębnianie antybiotyku A-22082.

Antybiotyk wytwarza się na drodze hodowli podpowierzchniowej z napowietrzaniem nowego szczepu *Aspergillus nidulans* NRRL 8112, prowadzonej do momentu wytworzenia znacznej aktywności antybiotycznej. Antybiotyk oddziela się od brzojki na drodze ekstrakcji za pomocą polarnych rozpuszczalników organicznych. Antybiotyk A-22082 wyodrębnia się różnymi metodami, na przykład chromatograficznie.

Sposób według wynalazku polega na tym, że prowadzi się hodowlę podpowierzchniową z napowietrzaniem szczepu *Aspergillus nidulans* NRRL 8112 w pożywce hodowlanej, zawierającej przyswajalne źródła węglowodanów, azotu oraz sole nieorganiczne, do momentu wytworzenia przez drobnoustroj znacznej aktywności antybiotycznej w określonej pożywce, po czym ewentualnie, antybiotyk A-22082 oddziela się od pożywki hodowlanej i w razie potrzeby, wyodrębnia się go.

Nowy antybiotyk A-22082 stanowi biały, bezpostaciowy proszek, rozpuszczalny w metanolu, etanolu, dwumetyloformamidzie, dwumetylosulfotlenku, octanie etylu oraz w wodnych roztworach o wartości pH większej od 7,0, natomiast jest nierozpuszczalny w eterze dwumetylowym i eterze naftowym. Dane analityczne antybiotyku A-22082 są następujące: przybliżony ciężar cząsteczkowy, określony za pomocą spektrometrii masowej i miareczkowania wynosi 1100.

2

Przybliżony skład: C 56,52%, H 7,29%, N 8,68, O 27,09.

Przybliżony wzór empiryczny: $C_{51-53}H_{79-83}N_7O_{17-19}$, a skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{25} -44^\circ$ (stężenie pomiarowe 0,5%, CH_3OH) i $[\alpha]_{365}^{25} -156^\circ$ (stężenie pomiarowe 0,5%, CH_3OH).

Widmo IR w KBr wykazuje następujące charakterystyczne maksima absorpcji, określone w mikronach: 2,97 silne, 3,30 słabe, 3,36 zbocze, 3,39 średnie, 3,47 słabe, 5,97 silne, 6,06 silne, 6,45 średnie, 6,53 średnie, 6,83 średnie, 7,78 słabe, 8,00 słabe, 9,07 słabe i 11,66 słabe.

Widmo UV zarówno w obojętnym, jak i zakwaszonym metanolu wykazuje maksima absorpcji przy 225 nm ($\epsilon = 18000$), 275 nm ($\epsilon = 3000$) i 284 nm (zbocze 2500), a w zalkalizowanym metanolu wykazuje maksima absorpcji przy: 245 nm ($\epsilon = 16000$) i 290 nm ($\epsilon = 3000$).

Widmo NMR ^{13}C wykazuje charakterystyczne piki o następujących wartościach δ ppm: 176,1, 174,3, 173,4, 172,7, 172,4, 169,8, 158,4, 132,8, 130,9, 129,6, 129,0, 116,2, 77,0, 75,7, 74,4, 71,3, 70,9, 69,6, 68,3, 62,4, 58,7, 56,9, 56,1, 52,9, 39,0, 38,5, 36,8, 35,2, 33,9, 32,9, 32,6, 30,7, 30,4, 30,2, 28,2, 27,0, 25,5, 23,6, 20,1, 19,6, 14,4, i 11,3.

Stwierdzono obecność miareczkowanej grupy o wartości pK_a 12,7 w 66% wodnym roztworze dwumetyloformamidu. Analiza aminokwasów po hydrolizie wykazała obecność treoniny, hydroksyproliny oraz trzech innych, dotychczas nie zidentyfikowanych aminokwasów. W wyniku chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym, w układzie rozwijającym benzen-metanol (7:3) i przy użyciu *Candida albicans* do bioautografii otrzymano $R_f = 0,35$, natomiast w wyniku chromatografii bibulowej z bioauto-

grafią przy użyciu *Candida albicans* otrzymano wartości R_f , podane w tablicy 1.

Tablica 1

Wartość R_f	Układ rozwijający
0,76	Butanol nasycony wodą
0,69	Butanol nasycony wodą i 2% kwasu p-toluenosulfonowego
0,75	Metanol — 0,1 n HCl (3:1)
0,17	Butanol-etanol-woda (13,5:15:150)
0,78	Metanol — 0,05 m cytrynian sodowy o pH=5,7 (7:3), bibuła buforowana 0,05 m cytrynianem sodu o pH = 5,7.

Wyniki analizy elementarnej odpowiadają szczególnie wzorowi empirycznemu $C_{52}H_{81}N_7O_{18} \cdot H_2O$, obliczono: C 56,24, H 7,54, N 8,84, O 27,39. Widma IR antybiotyku A-22082 w KBr podano na załączonym rysunku. Antybiotyk A-2208 jest podobny do polipeptydowego antybiotyku o nazwie Echinocandin B, opisanego ostatnio przez F. Benza i współpracowników w *Helvetica Chimica Acta* 57, 2459-2477 (1974), posiada jednak odmienne spektrum działania. Drobnoustroj, zdolny do produkcji antybiotyku A-22082, został sklasyfikowany jako szczep *Aspergillus nidulans* (Eidam) Wint., który należy do grupy *Aspergillus nidulans*. Klasyfikację przeprowadzono w oparciu o opis K.B. Rapera i D. I. Fennela w „The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Md. 1965. Określenia barw dokonano zgodnie z metodą ISCC-NBS (K.L. Kelly i D.B. Judd, „The ISCC-NBS Method of designating Color and a Dictionary of Color names” U.S. Dept. of Commerce, Circ 553, Washington D.C. 1955). Wzorce barw Maerza i Paula są opisane w A. Maerz and M.R. Paul „Dictionary of Color” McGraw-Hill Book Company, New York, N.Y., 1950. Hodowla szczepu prowadzona w temperaturze 25°C, o ile nie podano inaczej.

Charakterystyka hodowli szczepu *Aspergillus Nidulans* NRRL 8112. Roztwór agarowy Czapek'a.

Hodowla prowadzona w temperaturze 25°C osiąga po 2 tygodniach średnicę 4,0 cm. Kolonia jest drobno pofałdowana na powierzchni i ma silnie ząbkowane obrzeże, składające się z głęboko zanurzonych, brązowo-żółtych strzępek. Czasami pojawia się bezbarwna wydzielina, przechodząca w miarę starzenia się w różową. Luźno utkane, prawie kuliste główki konidialne pojawiają się dowolnie porozrzucone na powierzchni i wzdłuż obrzeża kolonii. W miarę dojrzewania główki konidialne stają się ciśniej utkane i przeplatane, ewentualnie osłonięte przez komórki grubościennne. Młody wzrost posiada barwę od białej do płowo-żółtej, przyjmując następnie barwę blade-żółto-zieloną (ISCC-NBS 12, Maerz i Paul 10-A-1). Po 2 tygodniach kolonia staje się bladopomarańczowo-żółta (ISCC-NBS 73, Maerz i Paul 10-B-3). Po trzech tygodniach rozlegle porozrzucone główki konidialne występujące czasami w skupiskach, mają barwę od białej do jasno-żółtej, przyjmując później barwę ciemną szarawo-żółtą (ISCC-NBS 91, Maerz i Paul 13-11-1). Żaden rozpuszczalny pigment nie jest produkowany. Lekko pofałdowany początkowo spód kolonii ma barwę od białej do jasnobrązowej (ISCC-NBS 57, Maerz i Paul 5-A-10), ciemniejąc w miarę starzenia przyjmuje ciemne, purpurowe odcienie.

Główki konidialne, początkowo rozchodzące się kulistcie, tworzą czasem krótkie zwarte kolumny. Młode główki kuliste osiągają do 70 mikronów, ale średnio mają 60 mikronów. Kolumnowe główki konidialne mają długość 75—125 μ i grubość 30—65 μ , a przeciętny wymiar $95 \times 47 \mu$. Konidiofory, pęcherzyki i fialidy są gładkościenne o barwie blade-brązowej. Długość konidioforu waha się w granicach 38—56 μ , ale może dojść do 85 μ . Szerokość konidioforu może dochodzić do 5 μ . Pęcherzyki są od prawie kulistych do półkulistych i mogą być płasko zakończone. Na ogół mają one średnicę 8—11 μ , przeciętnie 9,6 μ . Zgrubiałe strzępki, utrzymujące rodniak, są dwuseryjne natomiast wtórne strzępki zgrubiałe rzadko występują w parach. Pierwotne strzępki zgrubiałe są prawie klinowe. Długość ich wynosi 3,2—6,3 μ , przeciętnie 4,4 μ . W swoim najszerszym miejscu mają 2,8 μ . Strzępki wtórne mają kształt butelkowaty i wydłużony. Strzępki wtórne w swoim najgrubszym miejscu mają 3,4 mikrona i zmniejszają się do 1 mikrona. Długość ich wynosi 4,7—7,9 mikrona przeciętnie 6,2 μ . Zarodniki są drobno pofałdowane, kuliste i w masie mają zabarwienie od żółtego do zielonego. Średnica ich waha się w granicach 1,6—4,6 μ i wynosi przeciętnie 2,5 μ . Stadium workotwórcze zasklepia się na powierzchni w komórkach grubościennych, ale można je także znaleźć w głębi kolonii. Komórki grubościennne otaczające askokarp są bezbarwne i mogą być różowawe do brązowych, w miarę rozwoju kleistoteci. Są one kuliste do półkulistych lub owalne do wydłużonych i na ogół mają średnicę 14—18 μ . Kleistotecje są kuliste, grubościennne, przy czym młode są bezbarwne, a w pełni dojrzałe są ciemnopurpurowe. Średnia kleistoteci wynosi 185—320 μ , przeciętnie 200 μ . Worki nasienne są bezbarwne, od kulistych do owalnych i mogą się rozpaść zanim dojrzeje kleistotecja. Kuliste worki nasienne mają średnicę 12,6 μ . Owalne worki nasienne mają przeciętnie $14,1 \times 11,1 \mu$ i waha się w granicach 12,6—17,4 μ długości i 9,5—12,6 μ szerokości. Askospory są gładkie, pomarańczowe i ozdobione dwoma równoległymi delikatnie pofałdowanymi, ekwatorialnymi nieprzerwanymi zgrubieniami, o szerokości 0,8 μ . Zgrubienia ekwatorialne przechodzą przez osi długą soczewkowatej askospory o długości 4,3—5,1 μ i szerokości 2,7—3,5 μ , przeciętnie 4,5—3,2 μ . W przypadku, gdy zgrubienia przechodzą przez krótką osi askospory, wydają się one mieć średnicę, równą długości soczewkowatej askospory.

Hodowla na agarze z wyciągiem słodowym. Kolonie, hodowane w temperaturze 25°C, wzrastają gwałtownie, osiągając średnicę 5 cm w ciągu 10 dni i średnicę 7 cm w ciągu 3—4 tygodni. Kolonie są aksamitne i żółto-zielone. Około siódmego dnia wzrostu pojawiają się dowolnie porozrzucone małe skupiska komórek grubościennych, pokrywających askokarp na powierzchni kolonii i na obrzeżu. Skupiska komórek grubościennych, otaczających askokarp, stają się w miarę starzenia ciemnożółte. Ząbkowane obrzeże kolonii tworzą głęboko zanurzone, żółtawo-brązowe strzępki. Na ogół powierzchnia kolonii jest oliwkowo-zielona (ISCC-NBS 125, Maerz i Paul 24-L-1), a spód kolonii jest umiarkowanie oliwkowy (ISCC-NBS 107, Maerz i Paul 15-L-4).

Zarodnikowanie i stan workowaty są podobne do uzyskanych w hodowli na roztworze agarowym Czapek'a z kilkoma wyjątkami, a mianowicie: pęcherzyki są mniejsze, o średnicy 6,3—11,0 μ , przeciętnie 8,7 μ . Kuliste worki mają średnicę 11,0 μ , a owalne 11,1—12,6 μ długości i 9,5—10,3 μ szerokości, przeciętnie 11,3 $\mu \times 10,1 \mu$. Askospory mają przeciętnie 4,0 $\mu \times 3,2 \mu$.

Pewne cechy charakterystyczne szczepu *Aspergillus nidulans* NRRL 8112, produkującego antybiotyk A-22082, różnią się od cech charakterystycznych drobnoustroju, opisanego przez Rapera i Fennela. Szczep, produkujący antybiotyk A-22082, wytwarza mniejsze konidiofory, zarodniki i komórki grubościennie pokrywające askokarp, natomiast nieco większe główki konidialne i wtórne zgrubiałe strzępki utrzymujące zarodnik. Poza tym szczep, produkujący antybiotyk A-22082, wytwarza wydzielinę podczas gdy drobnoustroj opisany przez Rapera i Fennela tej wydzieliny nie wytwarza. Wszystkie pozostałe cechy charakterystyczne zgadzają się z opublikowanymi i potwierdzają identyfikację drobnoustroju, wytwarzającego antybiotyk A-22082, jako nowego szczepu *Aspergillus nidulans* (Eidom) Wint.

Hodowla szczepu *Aspergillus nidulans*, nadającego się do produkcji nowego antybiotyku A-22082, została zdeponowana i wchodzi w skład kolekcji szczepów Northern Regional Research Laboratory, U.S. Dept. of Agricultural Research Service, Peoria, Illinois 61604, gdzie jest ogólnie dostępna pod numerem NRRL 8112.

Szczep *Aspergillus nidulans* NRRL 8112 produkuje również znany związek sterigmatocystynę, którą ekstrahuje się z brzojki łącznie z antybiotykiem za pomocą polarnych rozpuszczalników organicznych. W celu oddzielenia antybiotyku od sterigmatocystyny stosuje się technikę wytrącania. Antybiotyk A-22082 oddziela się od innych składników brzojki na drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując do elucji mieszaninę acetonitrylu-woda (97:3). Antybiotyk A-22082 izoluje się od innych czynników drugorzędnych za pomocą chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym, stosując jako eluent acetonitryl z wodą (97:3).

Do hodowli *Aspergillus nidulans* NRRL 8112 można stosować dowolną pożywkę hodowlaną. Jednak ze względów ekonomicznych, z uwagi na optymalną wydajność i łatwość wyodrębnienia produktu korzystne są niektóre z pożywek. Korzystnym źródłem węglowodanów w procesie fermentacji, prowadzonym w dużej skali, jest sacharoza, chociaż można również stosować glikozę, maltozę, glicerynę i tym podobne. Korzystnymi źródłami azotu są: enzymatyczny hydrolizat kazeiny i wyciąg namoku kukurydzy. W skład pożywki hodowlanej mogą także wchodzić odżywcze sole nieorganiczne. Do soli tych należą zazwyczaj rozpuszczalne sole, stanowiące źródło jonów sodowych, magnezowych, wapniowych, amonowych, chlorkowych, węglanowych, siarczanowych, azotanowych i tym podobne. Podstawowe pierwiastki śladowe niezbędne do wzrostu i rozwoju drobnoustroju powinny także wchodzić w skład pożywki. Tego rodzaju pierwiastki występują powszechnie jako zanieczyszczenia innych składników pożywki w ilościach, wystarczających do zaspokojenia zapotrzebowania drobnoustroju w czasie wzrostu.

W przypadku wystąpienia pienienia w czasie fermentacji w dużej skali, może okazać się konieczny dodatek małej ilości, na przykład 0,2 ml/l środka przeciwpiennego takiego jak glikol polipropylenowy.

W celu wytworzenia znacznej ilości antybiotyku A-22082 korzystnie prowadzi się podpowierzchniową hodowlę z napowietrzaniem w tkankach fermentacyjnych. Małe ilości mieszaniny antybiotycznej można wytworzyć, prowadząc hodowlę w kolbach na trzęsawce. Ze względu na wydłużenie się czasu wytwarzania antybiotyku, zazwyczaj związane ze szczepieniem dużych tanków drobnoustrojem

w formie zarodnikowej, korzystne jest stosowanie inokulumu wegetatywnego.

Inokulum wegetatywne grzybni przygotowuje się przez szczepienie niedużej objętości pożywki drobnoustrojem w postaci zarodnikującej lub kawałkami grzybni, otrzymując świeżą aktywną hodowlę wzrostową drobnoustroju. Otrzymane inokulum wegetatywne przenosi się do dużego fermentora. Do hodowli inokulumu wegetatywnego można użyć tej samej pożywki, która jest stosowana w większych fermentacjach, jak również zastosować inne podłoże.

Drobnoustroj *Aspergillus nidulans* może być hodowany w temperaturach od około 20°C do około 40°C. Optymalne warunki produkcji A-22082 występują w temperaturze 25–30°C. Pożywkę hodowlaną napowietrza się rozproszonym jałowym powietrzem, stosując mechaniczne mieszanie za pomocą typowego mieszadła turbinowego, w całkowicie przegrodzonym tanku fermentacyjnym. Wydajną produkcję antybiotyku osiąga się wtedy, gdy stężenie rozpuszczonego w brzojce tlenu jest utrzymywane na poziomie 35% nasycenia powietrzem lub powyżej. Produkcję antybiotyku A-22082 można kontrolować w czasie fermentacji za pomocą badań, w których oznacza się aktywność antybiotyku w alkoholowym ekstrakcie z całej brzojki w stosunku do drobnoustroju wrażliwego na działanie antybiotyku.

Drobnoustrojem, stosowanym w badaniach zawartości antybiotyku A-22082, jest *Candida albicans*. Oznaczenia biologicznego dokonuje się dogodnie metodą dyfuzyjną krążków bibułowych na płytkach agarowych. Aktywność antybiotyku można na ogół wykryć w trzecim dniu fermentacji. Maksymalny wzrost aktywności antybiotycznej w hodowli *Aspergillus nidulans* występuje zazwyczaj między około 4 i 6 dniem.

Antybiotyk A-22082 jest użytecznym środkiem przeciwgrzybowym. Aktywność przeciwgrzybową antybiotyku A-22082 wykazano w testach in vitro. Aktywność przeciwgrzybową mierzono typową metodą dyfuzyjną krążków bibułkowych, stosując krążki o średnicy 6 mm, które zanurzono w roztworach, zawierających antybiotyk A-22082, a następnie nakładano na płytki agarowe, szczepione drobnoustrojem testowym.

W tablicy 2 zebrano wartości najmniejszego stężenia hamującego MIC dla krążków, przy których badany związek hamował drobnoustroje testowe.

Tablica 2

Drobnoustroj testowy	MIC μ g/krążek
<i>Candida Albicans</i>	0,625
<i>Trichophyton Mentagrophytes</i>	0,078
<i>Candida tropicalis</i>	3,12

Testy in vitro wykazują również, że antybiotyk A-22082 hamuje *Geotrichum candidum* oraz cztery gatunki *Microsporium*. Aktywność przeciwgrzybową antybiotyku A-22082 została następnie wykazana w testach in vivo. Po podaniu dwóch dawek antybiotyku myszom, zakażonym *Candida albicans*, otrzymano ochronę przeciw infekcji. Miara uzyskanej ochrony jest wartość ED₅₀ [dawka skuteczna w mg/kg, która zabezpiecza 50% myszy, patrz W. Wick i inni, J. Bacterial 81, 233–235 (1961)]. Dawka skuteczna antybiotyku A-22082 przeciwko *Candida albicans* u myszy wynosiła 30 mg/kg przy podawaniu dootrzewnowym i 50 mg/kg przy podawaniu podskórnym. U myszy, którym

podawano antybiotyk A-22082 dootrzewnowo lub podskórnie w dawkach 100 mg/kg dwa razy dziennie przez 3 dni (dawka całkowita 600 mg/kg), nie stwierdzono ostrej toksyczności. Ostrej toksyczności nie stwierdzono także przy podawaniu myszom antybiotyku A-22082 dootrzewnowo w dawkach 200 mg/kg 3 razy na dobę (dawka całkowita 600 mg/kg). Antybiotyk A-22082 przy stosowaniu jako środek przeciwgrzybowy podaje się pozajelitowo, zazwyczaj łącznie z dopuszczalnym w farmacji nośnikiem lub rozpuszczalnikiem. Dawkowanie antybiotyku A-22082 będzie zależało od rodzaju i ostrości konkretnej infekcji. W celu pełniejszego zilustrowania wynalazku podano niżej zamieszczone przykłady.

Przykład I. A. Wytwarzanie antybiotyku A-22082 przez hodowlę *Aspergillus nidulans* na trzcasawce. Hodowlę *Aspergillus nidulans* NRRL 8112 prowadzono na skosie agarowym o następującym składzie:

Składnik	Zawartość
Pasta pomidorowa	2%
Owsianka	2%
Agar	2%
Woda dejonizowana	94%

Na skos agarowy naniesiono szczep *Aspergillus nidulans* NRRL 8112, po czym szczepiony skos inkubowano w temperaturze 25°C przez 7 dni. Dojrzałą hodowlę pokryto surowicą wołową, po czym zeszkrobano zarodniki eż. Otrzymaną zawiesinę poddano liofilizacji, otrzymując 6 granuliek liofilizatu. Jedną granulę wyżej otrzymanego liofilizatu użyto do szczepienia 50 ml wegetatywnej pożywki o następującym składzie:

Składnik	Ilość
Glikoza	1,0%
Gliceryna	1,0%
Wytłoki nasion bawełny	2,5%
CaCO ₃	0,1%
Woda	95,4%

Szczepioną pożywkę wegetatywną inkubowano w 250 ml kolbach Erlenmeyera, w temperaturze 25°C przez 48 godzin na trzcasawce obrotowej (250 obr/min., amplituda 5,1 cm).

B. Wytwarzanie antybiotyku A-22082 przez hodowlę *Aspergillus nidulans* NRRL 8112 w tanku fermentacyjnym.

W celu uzyskania większej objętości inokulum, 10 ml powyżej opisanej inkubowanej pożywki, użyto do szczepienia 200 ml pożywki II generacji o tym samym składzie. Szczepioną pożywkę II generacji inkubowano w 2 litrowych kolbach Erlenmeyera, w temperaturze 25°C, przez 48 godzin na trzcasawce obrotowej przy 250 obr/min (amplituda 5,1 cm). 800 ml inkubowanej pożywki II generacji, przygotowanej wyżej opisanym sposobem, użyto do szczepienia 100 litrów jałowego podłoża produkcyjnego o następującym składzie:

Składnik	Ilość
Sacharoza	2,0%
Maltoza	1,0%
Ekstrakt słodowy	1,0%
Melasa	0,5%
Wyciąg namoku kukurydzy	0,5%
Hydrolizat enzymatyczny kazeiny*)	0,5%
Woda	94,5%

*) N-Z-Case, Sheffield Chemical CO. Norwich, N.Y.

Pożywka po sterylizacji w autoklawie, w temperaturze 120°C, przez 30 minut pod ciśnieniem 1,05—1,4 atm miała wartość pH = 7,1. Szczepione podłoże produkcyjne

pozostawiono do fermentacji w 165 litrowym tanku fermentacyjnym, w temperaturze 25°C, na okres 5 dni. Pożywkę napowietrzano jałowym powietrzem w ilości 0,4 obj./obj./min. Mieszanie prowadzono typowymi mieszadłami z szybkością 250 obr/min.

Przykład II. Oddzielanie antybiotyku A-22082.

200 ml gęstki pofermentacyjnej, całość otrzymaną sposobem, opisanym w przykładzie I, przesączono przy użyciu pomocniczego materiału filtracyjnego (ziemia okrzemowa-Hyflo Super-cel, Johns-Manville Products Corp). Odsączoną grzybnę ekstrahowano 100 l metanolu. Ekstrakt metanolowy zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości około 50 l. Zatężony ekstrakt metanolowy zakwaszono do pH = 3,5—4,0 przez dodanie kwasu solnego. Otrzymany roztwór ekstrahowano dwukrotnie 1/2 objętości chloroformu. Ekstrakty chloroformowe połączono i zatężono do objętości około 1 litra. 250 ml tego koncentratu dodano do 100 ml acetonitrylu. Otrzymany roztwór przesączono pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości około 150 ml. Otrzymany zatężony przesącz naniesiono na kolumnę 5,5×54 cm, wypełnioną żelalem krzemionkowym Woelm i eluowano mieszaniną acetonitrylu—woda (97:3), przy szybkości wypływu 5 ml na minutę, zbierając frakcje o objętości około 10 ml. Eluat kontrolowano metodą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym w układzie rozwijającym benzen-metanol (7:3). Detekcję antybiotyku A-22082 przeprowadza się za pomocą bioautografii szczepem *Candida albicans*. Frakcje 136—190 zawierały częściowo oczyszczony antybiotyk. Frakcje te połączono i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując 453 mg częściowo oczyszczonego antybiotyku.

Przykład III. Wyodrębnianie antybiotyku A-22082.

200 mg częściowo oczyszczonego antybiotyku A-22082 poddano chromatografii na kolumnie 5,5×6,0 cm, napelnionej żelalem krzemionkowym Woelm, stosując do elucji mieszaninę acetonitrylu-woda (95:5). Elucję prowadzono z szybkością 1 ml na minutę, zbierając frakcje o objętości 5 ml. Frakcje kontrolowano sposobem, opisanym w przykładzie II. Frakcje 1—3, zawierające antybiotyk A-22082, połączono i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem, otrzymując oleistą pozostałość. Oleistą pozostałość ponownie poddano chromatografii na kolumnie 1,5×12 cm, napelnionej żelalem krzemionkowym Woelm, stosując do elucji mieszaninę acetonitrylu-woda (97:7). Frakcje 15—20, zawierające antybiotyk A-22082, połączono i zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem do oleistej pozostałości. Otrzymaną oleistą pozostałość rozpuszczono w 2 ml metanolu, po czym roztwór metanolowy dodano do 20 ml eteru dwuetylowego. Wytrącony osad odsączono i wysuszono, otrzymując 35 mg antybiotyku A-22082.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku A-22082, **znamienny tym**, że prowadzi się hodowlę podpowierzchniową z napowietrzaniem szczepu *Aspergillus nidulans* NRRL 8112 w pożywce hodowlanej, zawierającej przyswajalne źródło węglowodanów, azotu oraz sole nieorganiczne, do momentu wyprodukowania przez drobnoustroj znacznej aktywności antybiotycznej w pożywce i ewentualnie oddziela się antybiotyk A-22082 od pożywki hodowlanej oraz ewentualnie wyodrębnia się antybiotyk A-22082.

