

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

71105

Patent dodatkowy
do patentu

MKP C12d 9/14

Zgłoszono: 11.08.70 (P. 142629)

Pierwszeństwo: 12.08.69 Stany
Zjednoczone
Ameryki

Int. Cl.² C12D 9/14

Zgłoszenie ogłoszono: 05.04.73

Opis patentowy opublikowano: 15.11.1976

Twórca wynalazku: _____

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

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku A16886

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowego antybiotyku, oznaczonego symbolem A16886 lub jego dopuszczalnych w farmacji soli.

Podczas fermentacji szczep *Streptomyces clavuligerus* produkuje nową substancję antybiotyczną, oznaczoną w niniejszym opisie jako antybiotyk A16886. Jego sole otrzymuje się bez trudu w reakcji z odpowiednim kwasem lub zasadą. Antybiotyk A16886 i jego sole wykazują aktywność przeciwbakteryjną i działanie przeciwrabacze. Działanie przeciwbakteryjne dotyczy przede wszystkim bakterii Gram-ujemnych oraz w pewnym stopniu także Gram-dodatnich. Antybiotyk A16886 jest także skuteczny w zwalczaniu chorób roślin pochodzenia bakteryjnego.

W szczególności wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania antybiotyku A16886 lub jego dopuszczalnych w farmacji soli, który to proces polega na hodowaniu szczepu *Streptomyces clavuligerus* NRRL 35 85 na pożywce, zawierającej przyswajalne źródła węgla, azotu i soli nieorganicznych w hodowli głębinowej z napowietrzaniem do otrzymywania znacznych ilości antybiotyku A16886, po czym wyodrębnia się go w postaci kwasu lub soli i ewentualnie sól rozdziela na czynniki A16886I i A162886II w postaci soli lub kwasów.

Antybiotyk A16886 jest produkowany podczas hodowli nowego szczepu, wyizolowanego z próbek gleby pochodzącej z Południowej Ameryki.

Drobnoustrój izolowano, zawieszając porcje próbek gleby w jałowej wodzie destylowanej i następnie nanosząc otrzymaną zawiesinę na pożywkę agarową. Zakażone płytki z agarem inkubowano przez kilka dni w temperaturze 25–35°C. Po zakończeniu inkubacji kolonie szczepu, produkującego antybiotyk A16886, przenoszono przy użyciu jałowego kółka platynowego na skosy agarowe, które inkubowano celem otrzymania odpowiedniej ilości inokulum do produkcji antybiotyku A16886.

Promieniowiec użyty zgodnie ze sposobem według wynalazku trudno jest zaklasyfikować do rodzaju *Streptomyces* z powodu jego nietypowej morfologii sporoforów. Jednak dane otrzymane z analizy ściany komórkowej wskazują, że szczep ten powinien być uważany za gatunek z rodzaju *Streptomyces*. W związku z tym drobnoustrój został potraktowany jako nowy gatunek i otrzymał nazwę *Streptomyces clavuligerus*.

Szczep charakteryzuje się wytwarzaniem grzybni powietrznej w postaci krótkich, sympodialnie rozgałęzionych strzępek, które ewentualnie dzielą się na zespoły spor. Tworzą się krótkie maczugowate gałęzie boczne,

który zwykle wytwarzają od 1 do 4 spor. Konidia nie są wytwarzane w grzybni podstawowej. Fotografia w mikroskopie elektronowym wykazuje gładkościenne spory. Hydrolizaty ściany komórkowej zawierają kwas L,L-dwuaminopimelinowy i glicynę obok głównych składników kwasu asparaginowego, kwasu glutaminowego i alaniny. Spory są azare en masse, a grzybnia podstawowa ma barwę od bladożółtej do żółto-brązowej. Pigmenty rozpuszczalne nie są wytwarzane. Optymalna temperatura hodowli wynosi od 26 do 30°C, powyżej 37°C brak wzrostu. Morfologicznie hodowla ta przypomina pewne szczepy *Thermonospora* i *Micromonospora*.

Nowy szczep zdolny do wytwarzania antybiotyku A16886 został przekazany do depozytu w Northern Utilization Research and Development Division, Agricultural Research Service, US. Department of Agriculture (dawniej Northern Regional Research Laboratories), Peoria, Illinois, 61604 i jest powszechnie dostępny pod numerem NRRL 35 85.

Charakterystykę szczepu *Streptomyces clavuligerus* NRRL 35 85 podano w tablicy 1, posługując się przy tym metodami charakteryzowania promieniowców zalecanymi przez International Streptomyces Projekt (Shirling i inni, „Methods for Characterization of Streptomyces Species”, Intern. Bull. Systemic Bacteriol. 16, 313, 1966) oraz pewnymi dodatkowymi testami. Do określania barw zastosowano metodę ISCC-NBS, opisaną przez Kelly'ego i in. w The ISCC-NBS Method of Designating Colours and a Dictionary of Colour Names (U.S. Department of Commerce Circ. 553, Washington, D.C. 1955). Oznaczenia w nawiasach zwykłych odnoszą się do serii barw według Tresnera i Backusa (Tresner i in., „System of Colour Wheels for Streptomyces Taxonomy”, Appl. Microbiol. 11, 335, 1968) a symbole barw są podkreślone. Symbole w nawiasach kwadratowych dotyczą oznaczenia barw według Maerz'a i Paula (Maerz i in., Dictionary of Colour, Mc Graw-Hill Book Co. Inc., New York, 1960). Szczep hodowano w ciągu 14 dni w temperaturze 30°C, o ile nie podano inaczej.

W tablicy 2 przedstawiono wyniki badań zdolności wykorzystywania źródeł węgla przez szczep NRRL 35-85.

Zastosowano następujące oznaczenia:

- + wzrost i przyswajanie
- brak wzrostu, brak przyswajania
- (+) prawdopodobne przyswajanie
- (-) wątpliwe przyswajanie

Antybiotyk A16886 jest produkowany podczas hodowli szczepu NRRL 35 85 przy użyciu różnego typu pożywek. Z wyników testu, przedstawionego w tablicy 2, widać jednak, że drobnoustrój jest zdolny do przyswajania tylko kilku źródeł węgla w warunkach sztucznej hodowli. Dla znających zagadnienie jest oczywistym, że drobnoustrój hodowany w kompletnej pożywce może przyswajać węgiel także ze źródeł, które w sztucznych warunkach hodowli są nieprzyswajalne. Jednak ze względów ekonomicznych, dla uzyskania maksymalnej wydajności antybiotyku oraz dla uproszczenia izolacji korzystnym jest używanie kilku względnie prostych substancji, do których np. należą łatwo przyswajalne związki takie, jak glukoza, skrobia, gliceryna, melasa, dekstryna i podobne.

Korzystnymi źródłami węgla są glukoza i gliceryna. Jako przyswajalne źródła azotu można stosować mąkę sojową, wyciąg namokowy kukurydzy, mąkę z nasion bawełny, wyciąg wołowy, pepton mięsny lub sojowy, kazeinę, mieszaninę aminokwasów i podobne. Korzystne jest stosowanie peptonów, mąki sojowej, mieszaniny aminokwasów i podobnych. Do soli nieorganicznych, wchodzących w skład pożywki, należą pospolite sole, zawierające jony sodowe, potasowe, amonowe, wapniowe, fosforanowe, siarczanowe, chlorkowe, węglanowe i podobne.

Do pożywki można również dodawać mikroelementy, niezbędne dla optymalnego wzrostu i rozwoju szczepu, produkującego antybiotyk A16886. Zazwyczaj jednak śladowe ilości tych pierwiastków towarzyszą w postaci zanieczyszczeń innym składnikom pożywki w ilościach, wystarczających na pokrycie zapotrzebowania podczas hodowli promieniowca, stosowanego zgodnie ze sposobem według wynalazku.

Wyjściowa wartość pH pożywki może być różna, stwierdzono jednak, że powinna wynosić od 6,5 do 7,2. Podobnie, jak w przypadku innych promieniowców, wartość pH pożywki wzrasta stopniowo podczas hodowli drobnoustroju i produkcji antybiotyku, osiągając wartość od 6,7 do 7,5 lub nawet wyższą. Końcowa wartość pH zależy, przynajmniej częściowo, od jego wartości początkowej, buforów znajdujących się w pożywce i czasu hodowli szczepu.

Warunkami z wyboru dla wytwarzania antybiotyku A16886 jest hodowla głębinowa z napowietrzaniem. W celu otrzymania względnie niewielkich ilości antybiotyku można posługiwać się hodowlą powierzchniową na trzęsawkach, natomiast do produkcji w większej skali korzystna jest fermentacja głębinowa z napowietrzaniem prowadzona w jałowych fermentorach. Pożywka w fermentorze może być zaszczepiana zarodnikującą postacią szczepu lecz z doświadczenia wiadomo, że następuje wtedy opóźnienie wzrostu, bardziej korzystnym jest więc

stosowanie postaci wegetatywnej szczepu. Pozwala to na lepsze wykorzystywanie urządzeń fermentacyjnych. W związku z tym najpierw przygotować należy inokulum wegetatywne przez zaszczepienie stosunkowo małej ilości pożywki zarodnikującą postacią szczepu. Otrzymane młode, aktywne inokulum wegetatywne przenosi się w sposób jałowy do dużego fermentora. Pożywka dla hodowli wegetatywnej może być taka sama lub inna, niż pożywka produkcyjna.

Drobnoustroj, produkujący antybiotyk A16886, można hodować w szerokim zakresie temperatur od 25 do 37°C, ale optymalną wydajność antybiotyku otrzymuje się w granicach temperatur od 26 do 30°C. Maksimum antybiotyku produkowane jest między 36 i 72 godziną od momentu zaszczepienia.

Jak zwykle, podczas hodowli głębinowej z napowietrzaniem przez pożywkę w fermentorze przepuszcza się powietrze w ilości 0,2–0,4 objętości na objętość pożywki w ciągu jednej minuty, korzystnie 0,40 objętości.

Stężenie wytwarzanego w czasie fermentacji antybiotyku może być z łatwością kontrolowane w brzeczce przez oznaczanie działania hamującego wzrost drobnoustrojów wrażliwych na A16886. Do szczepów takich należą *E.coli*, *Salmonella gallinarum* i *Pseudomonas solanacearum*. Oznaczenia wykonuje się metodą turbidymetryczną lub cylinderkowo-płytkową.

Z reguły maksimum wytwarzania antybiotyku obserwowano po 1 do 3 dni po zaszczepieniu, dotyczy to zarówno procesu prowadzonego na trzęsawce, jak i w fermentorze.

Antybiotyk A16886, wyprodukowany w procesie fermentacji, znajduje się w brzeczce fermentacyjnej. Zastosowana w sposobie według wynalazku technika izolacji pozwala na maksymalny odzysk antybiotyku z brzeczki. Grzybnię i nierozpuszczalne substancje stałe usuwa się z brzeczki, stosując zwykłe metody w rodzaju sączenia lub wirowania. Z przesączonej lub odwirowanej brzeczki odzyskuje się antybiotyk, stosując technikę ekstrakcyjną lub absorpcyjną.

W technice adsorbcyjnej stosuje się rozmaite adsorbenty, np. żel krzemionkowy, węgiel, tlenek glinu, mikrokrystaliczną celulozę oraz żywice jonowymiennne. Antybiotyk A16886 otrzymuje się w zależności od warunków prowadzenia fermentacji albo w postaci amfoterycznej albo w postaci soli, niezależnie jednak od postaci może być on adsorbowany z odpowiedniego roztworu na jednym z wymienionych lub podobnych adsorbentów, a później eluowany przez przemywanie odpowiednim rozpuszczalnikiem. Jeśli do elucji używa się roztworów np. roztworu mrówczanu amonowego lub octanu sodowego, otrzymuje się w efekcie sól amonową lub sodową antybiotyku. Sole te można z łatwością rewertować do wolnego antybiotyku.

Inne sole, poza amonową i solami metali alkalicznych, otrzymuje się w zwykły sposób w reakcji wolnego antybiotyku z odpowiednimi kwasami lub zasadami. Dla otrzymania więc kwasowych soli addycyjnych antybiotyk poddawany jest reakcji z kwasami organicznymi lub nieorganicznymi takimi, jak kwas solny, bromowodorowy, jodowodorowy, siarkowy, fosforowy, octowy, benzoesowy, sulfamowy, cytrynowy, maleinowy, bursztynowy, askorbinowy i glikolowy.

Antybiotyk A16886 tworzy również sole z kationami w reakcji z zasadami organicznymi oraz solami. Mogą to być np. sole amonowe, podstawione sole amonowe, sole metali alkalicznych takich, jak sód, potas, lit, ces i rubid; sole metali ziem alkalicznych takich, jak wapń, stront, bar oraz sole miedzi, cynku, magnezu i srebra. Jeśli idzie o zasady organiczne, to chociaż ich rodzaj nie jest istotny, korzystnymi są zasady, wykazujące w roztworze wodnym wartość pH = 3 lub wyższą. Do takich zasad należą między innymi benzyloamina, metyloamina, dwuetyloamina, trójetyletoamina, prokaina, dwuizopropyletoamina, etanoletoamina, cykloheksyletoamina, dwucykloheksyletoamina, dwufenyletoamina, dwu-n-butyletoamina, chinolina i pirydyletoamina.

Na ogół w stosowaniu farmaceutycznym bardziej korzystne są dopuszczalne w farmacji sole, niż wolny antybiotyk A16886. Są one również korzystne jako produkty przejściowe podczas produkcji, izolacji i oczyszczania antybiotyku. W terapii dopuszczalne w farmacji sole są na ogół równoważne, jeśli idzie o działanie, wolnemu antybiotykwowi A16886, niektóre jednak z nich są szczególnie korzystne dzięki swoim specyficznym właściwościom, np. lepszej rozpuszczalności, związanej z wprowadzeniem reszty, tworzącej sól.

Antybiotyk A16886 należy do grupy antybiotyków peptydowych, posiada charakter amfoteryczny i w cząsteczce zawiera siarkę. Podobnie, jak w przypadku innych drobnoustrojów, produkujących antybiotyki podczas fermentacji szczepu *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3583 otrzymuje się mieszaninę kilku substancji antybiotycznych zwanych „czynnikami”. Antybiotyk A16886 składa się z dwóch głównych substancji antybiotycznych, nazwanych przez nas antybiotykiem A16886I i antybiotykiem A16886II lub czynnikiem I i czynnikiem II. Podczas niektórych fermentacji obserwowano także powstawanie minimalnych ilości innych antybiotyków, których jednak nie izolowano i nie badano. W dalszej części opisu określenie antybiotyk A16886 będzie używane w stosunku do antybiotyku otrzymywanego w procesie fermentacji i zawierającego od 1 do 99% czynnika I, 99% do 1% czynnika II oraz minimalne ilości innych antybiotyków. W związku z tym w rozważaniach dotyczących metod wytwarzania i sposobów stosowania termin antybiotyk A16886 oznacza zarówno poszczególne czynniki, jak też ich mieszaniny, gdyż właściwości poszczególnych czynników i ich mieszanin są podobne.

Antybiotyk A16886 można stosować również w postaci soli np. addycyjnych soli z kwasami lub soli z kationami, w drugim przypadku mogą to być sole pojedyncze lub podwójne. Często jest korzystnym otrzymywanie soli bezpośrednio podczas procesu oczyszczania i izolowanie antybiotyków w postaci soli. Antybiotyk A16886 izoluje się w postaci soli jednoamonowej i dlatego podano charakterystykę tej postaci.

Mieszaninę czynników I i II poddano różnym badaniom. Między innymi przeprowadzono szereg jakościowych testów chemicznych mieszaniny soli jednoamonowych czynników I i II uzyskując dodatnie wyniki prób z odczynnikami: ninhydrynowym, Pan Dutscher'a, Benedict'a, Molisch'a, Fehlinga, chlorkiem dansylu, jodem i chlorkiem żelazowym oraz negatywne wyniki testu biuretowego i Sakaguchi. Mieszanina soli jednoamonowych czynników I i II suszona pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze pokojowej nad bezwodnym chlorkiem wapniowym w ciągu około 15 godzin wykazywała skręcalność właściwą $(\alpha)_D^{25}$, wynoszącą $+110,1^\circ$ ($c = 1$, woda). Mieszanina taka była trwała w zakresie wartości pH = 3–8 w temperaturze 6°C w ciągu 8 dni oraz względnie trwała w temperaturze 25°C w ciągu 2 dni. Aktywność biologiczna w temperaturze 25°C i przy wartości pH od 3 do 8 spadała w ciągu czterech dni do połowy.

Antybiotyk A16886 w postaci soli jednoamonowej można rozdzielić na czynniki I i II, nanosząc roztwór antybiotyku A16886 w mieszaninie acetonitrylu z wodą na kolumnę chromatograficzną wypełnioną celulozą. Kolumnę eluuje się mieszaniną acetonitrylu z wodą i kontroluje się zawartość każdego z czynników w odbieranych frakcjach. Frakcje, zawierające czynnik I, i frakcje, zawierające czynnik II, łączy się oddzielnie i liofilizuje. Otrzymuje się liofilizaty A16886I i A16886II w postaci soli jednoamonowych.

Sól jednoamonowa antybiotyku A16886I posiada następującą charakterystykę: biała, puszysta, bezpostaciowa substancja, topniejąca w zakresie temperatur $190\text{--}300^\circ\text{C}$ ze zmianą barwy na ciemnobrązową; dobrze rozpuszczalna w wodzie, słabo rozpuszczalna w niższych alkoholach, nierozpuszczalna w acetonitrylu; charakter amfoteryczny, posiada cztery dające się miareczkować grupy, których pKa wynoszą odpowiednio: $\text{pKa}_1 = 4,1$; $\text{pKa}_2 = 5,2$; $\text{pKa}_3 = 9,3$ i $\text{pKa}_4 = 10,5$; ciężar cząsteczkowy, obliczony na podstawie miareczkowania wynosi około 530; cząsteczka składa się z 40,26% węgla, 5,94% wodoru, 13,98% azotu, 33,37% tlenu i 7,21% siarki; skręcalność właściwa $(\alpha)_D^{25}$ wynosi $+153,6^\circ\text{C}$ ($C = 1$, woda); w widmie w podczerwieni w postaci zawiesiny w nujolu występują wyraźne pasma absorpcji przy długości fali 3,10; 5,68; 6,30; 6,60; 7,20; 7,60; 8,80; 9,35; 9,60; 9,85; 11,60 i 12,90 mikronów.

Sól jednoamonowa antybiotyku A16886 posiada następującą charakterystykę: biała, puszysta, bezpostaciowa substancja, topniejąca w zakresie temperatur od 190 do 300°C ze zmianą barwy na ciemnobrązową; dobrze rozpuszczalna w wodzie, słabo rozpuszczalna w niższych alkoholach, nierozpuszczalna w acetonitrylu; charakter cząsteczki amfoteryczny z czterema dającymi się miareczkować grupami, których pKa wynoszą odpowiednio: $\text{pKa}_1 = 4,1$; $\text{pKa}_2 = 5,2$; $\text{pKa}_3 = 9,3$ oraz $\text{pKa}_4 = 10,5$; ciężar cząsteczkowy, wyliczony na podstawie miareczkowania, wynosi około 528; cząsteczka składa się z 41,01% węgla, 5,60% wodoru, 15,75% azotu, 29,28% tlenu i 7,04% siarki; skręcalność właściwa $(\alpha)_D^{25}$ wynosi $+86,2^\circ\text{C}$ ($C = 1$, woda); w widmie w podczerwieni w zawiesinie w nujolu występują wyraźne pasma absorpcji przy długości fali 3,15; 5,70; 6,30; 7,22; 7,64; 9,05; 9,40; 9,65 i 11,60 mikronów.

Jednocześnie sole jednoamonowe czynników I i II były badane indywidualnie w sposób opisany powyżej. Podane uprzednio wartości skręcalności właściwej soli jednoamonowych antybiotyków A16886I i A16886II dotyczą soli, suszonych pod obniżonym ciśnieniem, w temperaturze pokojowej nad bezwodnym chlorkiem wapniowym w ciągu około 15 godzin. Miareczkowanie potencjometryczne wykonywano w 66% roztworze wodnym dwumetyloformamidu przy początkowej wartości pH, wynoszącej 6,50.

Do analizy elementarnej brano sole jednoamonowe antybiotyków A16886I i A16886II suszone pod obniżonym ciśnieniem, w temperaturze około 80°C nad pięciotlenkiem fosforu. Antybiotyk A16886I zawiera 5,02% grup metoksylowych, których obecność została potwierdzona obecnością w widmie magnetycznego rezonansu jądrowego singletu przy 3,53 ppm. Zawartość azotu aminowego w A16886I, oznaczona metodą Van Slyke'a, wynosi 5,3%.

Widmo magnetycznego rezonansu jądrowego antybiotyku A16886I w D_2O wykazuje następujące ugrupowania sygnałów: jednoprotentowy singlet przy 5,19 ppm., dwuprotonowy kwartet $J_{AB} = 13\text{ Hz}$ przy 4,94 ppm i 4,74 ppm, jednoprotentowy multiplet przy 4,0–4,2 ppm, dwuprotonowy kwartet $J_{AB} = 18\text{ Hz}$ przy 3,68 ppm i 3,32 ppm, trzyprotonowy singlet przy 3,53 ppm, dwuprotonowy multiplet przy 2,6–2,4 ppm i czteroprotonowy multiplet przy 2,1–1,6 ppm.

Widmo absorpcyjne w podczerwieni soli jednoamonowej A16886I w zawiesinie w nujolu przedstawione jest na rysunku fig. 1.

Widmo w nadfiolecie roztworu wodnego A16886I wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 242 mμ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 132$) i 264 mμ ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 165$). Pomiary dichroizmu kołowego, wykonywane w roztworze wodnym, wykazują dodatni efekt Cottona przy długości fali 263 mμ oraz ujemny przy 236 mμ.

Wartość R_F soli jednoamonowej A16886I podczas chromatografii na bibule Whatman 1, w układzie propanol, acetonitryl, woda (1 : 1 : 1) wynosi 0,41. Bioautograf wykonywano umieszczając chromatogram bibułowu na płytach z agarem zakażonym szczepem testowym *Salmonella gallinarum*.

Chromatografię cienkowarstwową wykonywano na dwóch typach nośników. Dla żelu krzemionkowego i 70% roztworu wodnego acetonitrylu jako układu rozwijającego wartość R_F wynosi około 0,51, dla celulozy i układu acetonitryl, izopropanol, woda (1 : 1 : 1) R_F = 0,36. W obu przypadkach płytki wywoływano odczynnikiem ninhydrynowym.

Analiza składu aminokwasowego kwaśnego hydrolizatu antybiotyku A16886I, wykonana metodą Spackmana, Moore'a i Steina, wykazała obecność dwóch reagujących z ninhydriną składników, z których jeden po elucji zidentyfikowano jako glicynę (0,61 $\mu\text{M}/\text{mg}$), drugi zaś jako kwas α -aminoadypinowy (1,97 $\mu\text{M}/\text{mg}$).

Miareczkowanie potencjometryczne soli jednoamonowej antybiotyku A16886II w 66% roztworze wodnym dwumetyloformamidu przy początkowej wartości pH, wynoszącej 7,7 wykazała obecność czterech dających się miareczkować grup o pK_{a1} = 4,4; pK_{a2} = 5,7; pK_{a3} = 9,6 oraz pK_{a4} = 10,4. Podczas miareczkowania przy pH początkowym równym 6,8 odpowiednie wartości wynosiły: pK_{a1} = 4,0; pK_{a2} = 5,3; pK_{a3} = 9,2 i pK_{a4} = 10,5.

Analiza soli jednoamonowej A16886II nie wykazała obecności grupy metoksyłowej, w przeciwieństwie do czynnika I nie stwierdzono także sygnału, odpowiadającego tej grupie w widmie magnetycznego rezonansu jądrowego. Zawartość azotu aminowego, oznaczona metodą Van Slyke'a, wynosi 5,1%.

Widmo magnetycznego rezonansu jądrowego antybiotyku A16886II w D_2O wykazuje następujące ugrupowania sygnałów: jednoprotonowy dublet J = 5 Hz przy 5,67 ppm, jednoprotonowy dublet J = 5 Hz przy 5,15 ppm, dwuprotonowy kwartet J_{AB} = 13 Hz przy 4,90 ppm i 4,68 ppm, jednoprotonowy multiplet przy 3,9–3,7 ppm, dwuprotonowy kwartet J_{AB} = 18 Hz przy 3,69 ppm i 3,99 ppm, dwuprotonowy multiplet przy 2,6–2,3 ppm oraz czteroprotonowy multiplet przy 2,1–1,5 ppm.

Widmo absorpcyjne w podczerwieni zawiesiny soli jednoamonowej A16886II w nujolu przedstawiono na rysunku fig. 2.

Widmo w nadfiolecie roztworu wodnego A16886II wykazuje maksimum absorpcji przy długości fali 260 μ ($E_{1\text{ cm}} = 148$). Pomiaru dichroizmu kołowego, wykonane w roztworze wodnym, wykazały dodatni efekt Cottona przy długości fali 258 $\text{m}\mu$ oraz ujemny przy 228 $\text{m}\mu$.

Wartość R_F soli jednoamonowej antybiotyku A16886II podczas chromatografii na bibule Whatman 1 w układzie propanol, acetonitryl, woda (1 : 1 : 1) wynosi 0,33. Bioautograf wykonywano umieszczając chromatogram bibułowu na płytkach z agarem zakażonym szczepem testowym *Salmonella gallinarum*.

Wartość R_F podczas chromatografii cienkowarstwowej na płytkach, pokrytych żelem krzemionkowym i rozwijanych 70% roztworem wodnym acetonitrylu, wynosi 0,42, zaś w przypadku zastosowania jako nośnika celulozy oraz układu rozwijającego zawierającego acetonitryl, izopropanol i wodę (1 : 1 : 1) R_F = 0,29. W obu przypadkach płytki wywoływano odczynnikiem ninhydrynowym lub wykonywano bioautograf.

Analiza składu aminokwasowego kwaśnego hydrolizatu antybiotyku A16886II, wykonywana metodą Spackmana, Moore'a i Steina, wykazała początkowo obecność jednego tylko składnika reagującego z ninhydriną i zidentyfikowanego po elucji jako kwas α -aminoadypinowy (2,1 $\mu\text{M}/\text{mh}$). Zaobserwowano jednak także bardzo małe maksimum absorpcji należące do składnika, który eluował się identycznie, jak glicyna. W następnej próbie analizowanej w identyczny sposób stwierdzono zawartość pierwszego składnika 2,1 $\mu\text{M}/\text{mh}$ i drugiego 0,13 $\mu\text{M}/\text{mg}$.

Dodatkowo oba czynniki I i II w postaci soli jednoamonowych poddawano chromatografii bibułowej i cienkowarstwowej wykorzystując szereg dalszych układów rozwijających i uzyskując wyniki podane w tablicy XIV.

Antybiotyk A16886 i jego sole wykazują działanie hamujące wzrost zarówno bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych. Stężenia, przy których antybiotyk A16886 w postaci częściowo oczyszczonej mieszaniny soli jednoamonowych czynnika I i II wykazuje działanie hamujące wzrost różnych drobnoustrojów, podane są w tablicy 3. Stężenia hamujące, oznaczone metodą płytkową lub metodą rozcieńczeniową, oznaczono odpowiednio symbolami „m.p.” lub „m.r.”.

W metodzie płytkowej badany drobnoustrój nanoszono na serię płytek z agarem, zawierającym różne stężenia antybiotyku A16886I i A16886II w postaci soli jednoamonowych i oznaczano minimalne stężenie hamujące wzrost drobnoustrojów w mikrogramach na milimetr w podłożu agarowym, w okresie 48 godzin lub w przypadku mikroorganizmów, wywołujących choroby roślin w czasie 72 godzin.

W metodzie rozcieńczeniowej serię próbek, zawierających różne stężenia soli jednoamonowych czynników I i II zakażono badanym drobnoustrojem i oznaczono najmniejsze stężenie hamujące (w mg/ml) wzrost drobnoustroju w podłożu płynnym w ciągu około 20 godzin.

W żadnym z powyższych testów nie zaobserwowano wiązania się antybiotyku z surowicą końską. Jak wynika z tablicy 3, antybiotyk A16886 w postaci mieszaniny soli jednoamonowych czynnika I i II wykazuje działanie hamujące w stosunku do bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych.

Działanie przeciwbakteryjne antybiotyku A16886 oznaczano także metodą krążkową dyfuzji w agarze według Beuera-Kirbye'go. Badaniu poddano oddzielnie sole jednoamonowe czynnika I i II. Tablica 4 przedstawia wyniki testu, wyrażone w podanej w milimetrach wielkości strefy zahamowania dla danego stężenia.

Antybiotyk A16886 i jego sole wykazuje również działanie hamujące wzrost wielu powyższych drobnoustrojów *in vivo* i jest dlatego użyteczny w leczeniu zakażeń, wywołanych przez nie u zwierząt nosicieli pasożytów. Toksyczność antybiotyku dla ssaków jest niska LD_{50} wynosi więcej niż 5 g/kg. Codzienne podawanie podskórne 350 mg/kg grupie 10 szczurów nie spowodowało w ciągu 14 dni żadnego wypadku śmiertelnego ani zauważalnych objawów zatrucia. Antybiotyk A16886 w postaci mieszaniny jednoamonowych soli czynników I i II wykazuje następujące wartości ED_{50} u myszek, zakażonych różnymi drobnoustrojami:

Antybiotyk A16886 i jego sole wykazuje działanie przeciw bakteriom wywołującym choroby roślin i może być stosowany do leczenia takich chorób, jak powodowane przez bakterie więdnienie i opadanie liści, śnieć oraz bakteryjną chorobę plamistą liści.

Sposób stosowania antybiotyku w ochronie roślin może być rozmaity. Zazwyczaj pierwsze zetknięcie drobnoustrojów z rośliną odbywa się za pośrednictwem liści, stąd korzystne jest częste podawanie antybiotyku tą drogą. Antybiotyk A16886 i jego sole są jednak wchłaniane przez rośliny i dlatego można go podawać do gałęzi, kwiatów, nasion, korzeni i innych części, uzyskując efekt bakteriobójczy w całej roślinie.

Zwalczanie bakterii, wywołujących choroby roślin, polega na podawaniu skutecznych ilości antybiotyku. Bez znaczenia jest przy tym, czy stosuje się osobno poszczególne czynniki, bowiem zarówno mieszanina, jak i każdy z czynników I i II, użyte osobno dają dobre wyniki. Antybiotyk A16886 lub jego sole można stosować bezpośrednio w postaci substancji, na ogół jednak korzystne jest dla zwalczania bakteryjnych chorób roślin stosowanie kompozycji antybiotyku z jednym lub więcej adjuwantami. Tak więc antybiotyk lub jego sole można podawać w roztworach z wodą lub innymi nośnikami ciekłymi, rozpuszczalnymi organicznymi, ciekłymi lub stałymi środkami powierzchniowo czynnymi, obojętnymi dobrze sproszkowanymi lub granulowanymi stałymi nośnikami. Stężenie antybiotyku nie jest wielkością krytyczną i może się zmieniać w zależności od przeznaczenia. Na ogół do zwalczania typowych zakażeń bakteryjnych u roślin przez podawanie antybiotyku do liści, dobre wyniki otrzymuje się przy stężeniu od 10 do 1000 i więcej promili. W przypadku użycia postaci pylistej korzystne stężenie wynosi 0,1–1%.

W celu przygotowania kompozycji płynnych antybiotyków A16886 lub jego sole można mieszać z odpowiednimi nośnikami ciekłymi i emulgatorami, otrzymując w ten sposób dające się emulgować koncentraty, które przed użyciem rozcieńcza się wodą lub innymi rozpuszczalnikami, uzyskując mieszaniny do spryskiwania. Do korzystnych środków emulgujących należą emulgatory niejonowe takie, jak produkty kondensacji tlenków alkilenowych z kwasami nieorganicznymi, pochodne polioksyetylenowe estrów sorbitolu, kompleksy eterów z alkoholami i podobne. Do rozpuszczalników organicznych, stosowanych do przygotowywania kompozycji, należą między innymi oleje mineralne lub ich poszczególne składniki, toluen lub syntetyczne oleje organiczne. Substancje powierzchniowo czynne są używane zazwyczaj w ilości 0,1–20% wagowych w stosunku do ciężaru całej mieszaniny. Do mieszanin pylistych można wykorzystywać każdą dobrze sproszkowaną lub granulowaną substancję, stosowaną do innych środków chemicznych, używanych w rolnictwie.

Antybiotyk A16886 i jego sole lub odpowiednie kompozycje mogą być rozpylane w dowolny sposób, np. przy pomocy rozpylaczy ręcznych lub wysokociśnieniowych. Kompozycje stosowane do spryskiwania liści nie mogą zawierać nawet nieznacznych ilości rozpuszczalników fitotoksycznych. Dla spryskiwania dużych obszarów mogą być stosowane samoloty.

W opisanych poniżej badaniach stosowano antybiotyk A16886 w postaci soli jednoamonowych czynników I i II.

Badano działanie hamujące *in vitro* wzrost szczepów *Erwinia amylovera* i *Pseudomonas solanacearum* w następujący sposób. Każdym z drobnoustrojów zakażano osobno standartową pożywkę agarową, którą rozlewano na szereg płytek i pozostawiano do zastygnięcia. Badania prowadzono różnymi metodami. W pierwszej do dwóch cylinderek stałowych umieszczonych na powierzchni agaru dodawano po 0,1 ml badanego roztworu, w drugiej zaś dwa krążki bibułowe nasyczone 0,1 ml badanego roztworu nakładano na powierzchnię agaru. Badany roztwór antybiotyku przygotowywano, rozpuszczając odpowiednią jego ilość w wodzie destylowanej w aparaturze szklanej. Wielkości afer zahamowania podaje tablica 6.

Badano działanie antybiotyku A16886 *in vivo* na *Pseudomonas solanacearum* na plantacji pomidorów. Do badania przygotowano roztwory wodne, zawierające 1% etanolu, 0,1% środka powierzchniowo czynnego

(pochodna polioksyetylenowa częściowo zestryfikowanego kwasem tłuszczowym sorbitolu) oraz różne stężenie antybiotyku po dwie sztuki w donicach. Sadzonki w każdej donicy opryskiwano jednym z powyższych roztworów, pozostawiono do wyschnięcia na powietrzu i zakażano aktywną hodowlą *Pseudomonas solanacearum*. Wszystkie rośliny przetrzymywano w ciągu 24 godzin w komorze wilgotnej, a następnie 7 dni w normalnych warunkach. Po zakończeniu tego okresu wszystkie rośliny przeglądano dla oceny stopnia zakażenia. Wyniki przedstawiono w tablicy 7, posługując się skalą ocen od 0 do 4, gdzie 0 oznacza całkowity brak działania, a 4 całkowite wyleczenie.

Jak widać z tablicy 7 w grupie roślin kontrolnych obserwuje się silne zakażenie *Pseudomonas solanacearum*.

Badano działanie antybiotyku A16886 na *Pseudomonas glycinea* podczas zanurzania korzeni roślin do roztworu, zawierającego antybiotyk. Przygotowano w tym celu dwa roztwory o stężeniu antybiotyku A16886 wynoszącym odpowiednio 200 i 400 części na milion. Zakażano dziesięciodniowe sadzonki soi szczepem *Pseudomonas glycinea*, a następnie w czasie przeprowadzania doświadczenia korzenie wszystkich roślin namaczano w wodnych roztworach antybiotyku. Początkowo zakażone rośliny namaczano w 50 ml roztworu, w tym jedną grupę w roztworze o stężeniu 200 części na milion, drugą w roztworze o stężeniu 400 części na milion oraz trzecią grupę kontrolną w wodzie. Korzenie moczoło w ciągu 24 godzin, napowietrzając w tym czasie roztwór. Następnie wszystkie rośliny z korzeniami zanurzonymi w roztworze inkubowano w ciągu 24 godzin. Po wyjęciu z komory inkubacyjnej rośliny przetrzymywano jeszcze przez tydzień. Począwszy od rozpoczęcia inkubacji do końca doświadczenia podawano roślinom roztwór, zawierający składniki odżywcze niezbędne dla utrzymywania ich przy życiu. Po zakończeniu doświadczenia rośliny obserwowano w celu określenia stopnia rozwoju *Pseudomonas glycinea*. Wyniki przedstawiono w tablicy 8, posługując się opisaną poprzednio skalą ocen.

Podczas pierwszego doświadczenia, mającego na celu ocenę działania *Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis* przy spryskiwaniu liści, dziesięciodniowe sadzonki soi zakażano, namaczając dolne powierzchnie liści w zawieszynie, zawierającej *Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*. Dwie godziny później liście jednej grupy roślin spryskiwano roztworem, zawierającym antybiotyk A16886 w stężeniu 100 części na milion oraz liście drugiej grupy roślin roztworem, zawierającym 500 części na milion. Roztwór antybiotyku A16886 przygotowywano w wodzie z 353 częściami na milion mieszaniny niejonowych ciekłych emulgatorów sulfonowych.

W drugim doświadczeniu liście dziesięciodniowych sadzonek soi spryskiwano najpierw roztworem, zawierającym 100 lub 500 części na milion antybiotyku A16886, przygotowanego, jak w doświadczeniu pierwszym, a dwie godziny później zakażono również w identyczny sposób.

Roślinom zapewniono dobre warunki rozwoju w ciągu około 11 dni i badano na obecność lub brak *Xanthomonas phaseolicola* var. *sojensis*. Wyniki podano w tablicy 9, posługując się skalą ocen taką, jak podano poprzednio.

W celu oceny działania na *Pseudomonas phaseolicola* przy spryskiwaniu liści wszystkie powierzchnie dwudziestodniowych sadzonek fasoli czerwonej spryskiwano wodnym roztworem, zawierającym 400 części na milion antybiotyku A16886 oraz 0,1% środka powierzchniowo czynnego (pochodną polioksyetylenową częściowo zestryfikowanego kwasem tłuszczowym sorbitolu). Po wyschnięciu rośliny zakażano *Pseudomonas phaseolicola*, namaczając dolną powierzchnię jednego listka z każdego pierwszego i drugiego okółka liściowego wodną zawiesiną bakterii, wykazującą 30% transmisji mierzonej na spektrofotometrze Spectronic 20 produkcji firmy Bausch i Lomb. Następnie rośliny przetrzymywano w ciągu 24 godzin w komorze wilgotnej, a następnie w ciągu 14 dni zapewniano im dobre warunki rozwoju. Pod koniec tego okresu badano wszystkie rośliny, stwierdzając w opryskiwanej grupie umiarkowane zakażenie *Pseudomonas phaseolicola*, podczas gdy w grupie kontrolnej zakażenie to było intensywne.

W celu oceny działania na *Pseudomonas solanacearum*, przez spryskiwanie liści lub łodyg przygotowywano wodny roztwór, zawierający 353 części na milion mieszaniny dwóch niejonowych ciekłych emulgatorów sulfonowych oraz 100 lub 400 części na milion antybiotyku A16886. Badania prowadzone na dwóch grupach osiemnastodniowych sadzonek pomidorów. Jednej grupie podawano roztwór tylko do liści, drugiej tylko do łodyg. W dwie godziny później obie grupy zakażono, wprowadzając wykałaczką namoczoną w hodowli *Pseudomonas solanacearum* do łodygi przy liścienu. Roślinom zapewniono dobre warunki rozwojowe w ciągu 10 dni i obserwowano wyniki leczenia, które przedstawiono w tablicy 10, posługując się skalą ocen taką samą, jak w poprzednich doświadczeniach.

Jak już wspomniano, antybiotyk A16886 i jego sole wykazują obok aktywności przeciwbakteryjnej działanie przeciworobacze. Antybiotyk A16886 i jego sole można podawać zwierzętom stałocieplnym w celu zwalczania różnych pasożytów wewnętrznych, szczególnie pasożytów żołądka i jelit takich, jak *Ascaris lumbricoides* var. *sum*, *Nematospiroides dubius*, *Aspiculuris tetraptera*, *Syphacia obvelata* i podobnych. Podobnie, jak w przypadku aktywności przeciwbakteryjnej, działanie przeciworobacze wykazują oba czynniki zarówno podawane pojedynczo, jak i w mieszance.

Antybiotyk A16886 korzystnie jest podawać doustnie np. z pokarmem dla zwierząt w postaci tabletek, płynów itp. Skuteczna dawka podczas kuracji wynosi na ogół od 1 do 500 mg na kilogram wagi ciała zwierzęcia. Jeśli antybiotyk jest podawany przez dłuższy okres czasu w pokarmie stężenie od 0,01 do 0,05% daje wystarczająco dobre wyniki. Korzystne stężenie wynosi od 0,01 do 0,05%.

W poniższych doświadczeniach badano działanie przeciworobacze w antybiotyku A16886 podawanego w postaci mieszaniny soli jednoamonowych czynników I i II.

Antybiotyk A16886 podawano w pojedynczej dawce każdej z dwóch myszy, zarażonych *Aspiculuris tetraptera* i *Syphacia obvelata* (owsiki). Dawka antybiotyku w postaci zawiesiny w soli fizjologicznej, zawierającej 0,125% metylocelulozy (czynnik rozpraszający), wynosiła 500 mg na kilogram wagi ciała. Grupę kontrolną, składającą się z sześciu myszy, zarażano *Aspiculuris tetraptera* i *Syphacia obvelata*. Obie grupy pozostawiano na okres 48 godzin w normalnych warunkach hodowlanych, a następnie wszystkie myszy zabijano i sprawdzano obecność i ilość owsików. Wyniki przedstawiono w tablicy 11.

Antybiotyk A16886 mieszano ze standartowym pokarmem dla myszy, otrzymując pokarm o zawartości antybiotyku, wynoszącej 0,005, 0,01 i 0,05% wagowych. Do doświadczenia używano grupy, składające się z pięciu myszy. Po około 24 godzinach po rozpoczęciu karmienia pokarmem, zawierającym antybiotyk, myszki zarażono *Ascaris lumbricoides* var. *sum*. Grupę kontrolną również zarażoną karmiono pokarmem, nie zawierającym antybiotyku. Wszystkie grupy karmiono w ciągu 10 dni, a następnie pokarm odstawiono. Jednocześnie wszystkie myszy zabito i badano ich płuca sprawdzając obecność i ilość uszkodzeń wywołanych przez *Ascaris lumbricoides* var. *sum*. Wyniki przedstawiono w tablicy 12.

Podobne badania przeprowadzono, stosując inne stężenia antybiotyku. Wyniki przedstawiono w tablicy 13.

Sposób według wynalazku zilustrowany jest następującymi przykładami.

P r z y k ł a d I. Otrzymywanie antybiotyku w kolbach na trzęsawce.

Zarodnikującą hodowlę szczepu *Streptomyces clavuligerus* otrzymywano na drodze hodowli drobnoustrojów na skosach z pożywką agarową o następującym składzie:

Dekstryna	10,0 g
Ekstrakt drożdżowy	1,0 g
Hydrolizat kazeiny	
(N-Z Amine-Type A	
firmy Sheffield Chemical	
Company)	2,0 g
Wyciąg wołowy	1,0 g
Woda po jonitach	1 litr

Dodatkiem wodorotlenku sodowego pH pożywki korygowano do wartości 7.

Skosy agarowe zaszczipiano zarodnikami szczepu *Streptomyces clavuligerus* NRRL 35 85, inkubowano w ciągu czterech dni w temperaturze 30°C, po czym pokrywano jałową wodą destylowaną i delikatnie skrobano celem otrzymania zawiesiny zarodników i komórek w wodzie. 1 ml otrzymanej zawiesiny zaszczipiano porcję po 100 ml podłoża dla hodowli wegetatywnej o następującym składzie:

Glukoza	15,0 g
Mąka sojowa	15,0 g
Wyciąg namokowy	
kukurydzy	5,0 g
Węglan wapnia	2,0 g
Chlorek sodu	5,0 g
Woda po jonitach	1 litr

Wartość pH pożywki korygowano do 6,7 dodatkiem wodorotlenku sodowego. Inokulum wegetatywne wstrząsano w ciągu 24–48 godzin na trzęsawce wahadłowej (skok 5 cm, 108 wahań na minutę). Tak przygotowane inokulum używano do wytwarzania antybiotyku A16886. Pożywka produkcyjna posiadała następujący skład:

Mąka sojowa	15,0 g
Kazeina	1,0 g
Azotan sodu	3,0 g
50% syrop glukozy	20,0 g
Woda wodociągowa	1 litr

Porcje po 100 ml pożywki produkcyjnej umieszczano w kolbach Erlenmeyera o pojemności 500 ml i sterylizowano w ciągu 30 minut w temperaturze 120°C. Po schłodzeniu każdą kolbę zaszczepiano dodatkiem 5% inokulum wegetatywnego. Fermentację prowadzono w ciągu 48–72 godzin w temperaturze 25–30°C na trzęsawce obrotowej (250 obr/min). Podczas fermentacji pożywkę napowietrzano 0,4 objętościami powietrza na minutę.

Izolację prowadzono w poprzednio opisany sposób.

Przykład II. Antybiotyk otrzymywano w sposób, opisany w przykładzie I, używając trzęsawkę wahadłową (108 wahań na minutę) i stosując następującą pożywkę produkcyjną:

Sucha pozostałość po całkowitym oddestylowaniu zacieru gorzelnianego

(Nadrisol)	5,0 g
Mąka sojowa (Nutrisoy 200D)	5,0 g
Mąka arachidowa	5,0 g
Melasa	5,0 g
Mąka owsiana	5,0 g
Gliceryna	10,0 g
Woda wodociągowa	1 litr

Przykład III. Antybiotyk A16886 otrzymywano, jak w przykładzie I, stosując pożywkę produkcyjną o następującym składzie:

Mąka owsiana	20,0 g
Gliceryna	10,0 g
Woda wodociągowa	1 litr

Przykład IV. Antybiotyk A16886 otrzymywano, jak w przykładzie I, stosując pożywkę produkcyjną o następującym składzie:

Mąka z nasion bawełny	20,0 g
Gliceryna	10,0 g
Glukoza	5,0 g
Woda wodociągowa	1 litr

Przykład V. Antybiotyk A16886 otrzymywano, jak w przykładzie I, stosując pożywkę produkcyjną o następującym składzie:

Glukoza	20,0 g
Skrobia rozpuszczalna	10,0 g
Pepton (Wilson 159)	30,0 g
Hydrolizat kazeiny	
(N-Z-amino-Tyrd A)	4,0 g
Siarczan magnezu siedmiowodny	5,0 g
Melasa	5,0 g
Węglan wapnia	2,0 g
Woda wodociągowa	1100 ml

Przykład VI. Antybiotyk A16886 otrzymywano, jak w przykładzie I, stosując następującą pożywkę produkcyjną:

Gliceryna	20,0 g
Pepton sojowy	5,0 g
Azotan wapnia	2,0 g
Chlorek sodu	0,5 g

Sucha pozostałość po całkowitym oddestylowaniu zacieru gorzelnianego

(Nadrisol)	3–0 g
Woda wodociągowa	1 litr

Przykład VII. Innego rodzaju zarodnikującą hodowlę szczepu *Streptomyces clavuligerus* NRRL 35 85 otrzymano, hodując drobnoustrój na skosach z pożywką agarową, która w tym przypadku miała następujący skład:

Dekstryna	10,0 g
Wyciąg drożdżowy	1,0 g
Hydrolizat kazeiny	2,0 g
Wyciąg wołowy	1,0 g
Chlorek wapnia siedmiowodny	0,01 g
Agar Mear'a	20,0 g
Woda po jonitach	1 litr

Wartość pH pożywki korygowano dodatkiem wodorotlenku sodowego do 6,5.

Skosy agarowe zaszczepiano zarodnikami *Streptomyces clavuligerus* NRRL 35 85, inkubowano w ciągu 7–10 dni w temperaturze 30°C i delikatnie zeskrobywano zarodniki, dodając do nich 2 ml jałowej surowicy wołowej. 0,1 ml zawiesiny zarodników w surowicy poddawano liofilizacji w wyjałowionych ampułkach, liofilizat używano do zaszczepiania pożywki dla hodowli wegetatywnej o następującym składzie:

Gliceryna	10,0 g
Sacharoza	20,0 g
Srut sojowy	15,0 g
Amber BYF 300	5,0 g
(Hydrolizat drożdży piwnych firmy Amber Lab.)	
Trypten	5,0 g
Potasu fosforan II-zas.	0,20 g
Woda wodociągowa	1 litr

Wartość pH pożywki, wynoszącą 6,2, korygowano dodatkiem wodorotlenku sodowego do wartości 6,5.

Przykład VIII. Produkcja doświadczalna antybiotyku A16886.

Fermentor ze stali kwasoodpornej o pojemności 40 l napełniano 24 litrami pożywki o następującym składzie:

Antofoam A (środek przeciwpienny produkowany przez Dow Corning Company)	5,0 g
Skrobia	1.125,0 g
Sucha pozostałość po całkowitym oddestylowaniu zacieru gorzelnianego	
(Nadrisol)	125,0 g
Śrut sojowy	500,0 g
Gliceryna	187,5 g
Hydrolizat kazeiny	
(N-Z Amine A)	125,0 g
Siarczan żelazawy siedmiowodny	2,50 g
Zimna woda wodociągowa	do 24 litrów

Wyjściową wartość pH, wynoszącą 5,9, korygowano do 6,5 dodatkiem około 20 ml 5N wodorotlenku sodowego. Pożywkę sterylizowano w ciągu 30 minut, w temperaturze 120°C i pod ciśnieniem 1,1–1,3 atn., a następnie schładzano i zaszczepiano 5% inokulum wegetatywnego, otrzymanego, jak w przykładzie VII. Fermentację prowadzono w temperaturze 30°C w ciągu 66 godzin, przepuszczając jałowe powietrze w ilości 0,35 objętości na objętość pożywki w ciągu jednej minuty. Mieszano mieszadłem mechanicznym przy 420 obr/min. Końcowa wartość pH wynosiła 6,3.

Antybiotyk A16886 izolowano z brzezki w sposób, opisany w przykładzie IX.

Przykład IX. Izolacja surowego antybiotyku A16886 w postaci soli jednoamonowej.

Około 75 litrów brzezki, otrzymanej w sposób opisany w przykładzie VIII, przesączono z dodatkiem 5 gramów na 100 ml ziemi okrzemkowej (Hyflo Super-Cel produkowanej przez Johns-Manville Products). Przesącz przepuszczano przez kolumnę, załadowaną 8 litrami węgla aktywnego (Pittsburgh 12 x 40) z szybkością 60 ml/min. Kolumnę przemywano 10 litrami odmineralizowanej wody o wartości pH = 5,2, a następnie antybiotyk zaadsorbowany na węglu eluowano, przepuszczając przez kolumnę 50% roztwór acetonu w wodzie. Połączone frakcje, zawierające antybiotyk, zateżano pod zmniejszonym ciśnieniem w celu usunięcia acetonu i podawano na kolumnę o wymiarach 9,5 x 140 cm załadowaną silnie zasadowym wymienniczym jonowym Dowex 1-X1 w formie mrówczanowej. Kolumnę przemywano 10 litrami demineralizowanej wody, a antybiotyk eluowano 0,1 molarnym roztworem mrówczanu amonu. Połączone frakcje zawierające antybiotyk przepuszczano przez kolumnę o wymiarach 9,5 x 100 cm załadowaną węglem aktywnym (Pittsburgh 12 x 40) z szybkością 60 ml/min. Kolumnę przemywano wodą, a następnie antybiotyk eluowano mieszaniną wody i acetonu (4 : 1)

z szybkością 60 ml/min., zbierając dwie frakcje po 15 litrów oraz następnie mieszaniną wody i acetonu (1 : 1), odbierając jedną 18-litrową frakcję. Połączone frakcje antybiotyku zatężano pod zmniejszonym ciśnieniem w celu usunięcia acetonu i liofilizowano.

40 gramów liofilizatu ekstrahowano 4 litrami metanolu mieszając mieszadłem elektromagnetycznym w ciągu 16 godzin. Po odsączeniu części nierozpuszczalnych do roztworu dodano 5 objętości acetonu, wytrącony osad odsączono i suszono. Wydajność 20,6 g. Osad rozpuszczano w minimalnej ilości wody i naniesiono na kolumnę o wymiarach 5,8 x 120 cm, załadowaną Spehadexem G-25 z szybkością 1 ml/min. Eluowano demineralizowaną wodą, frakcje, zawierające antybiotyku połączone i liofilizowano.

Liofilizat w ilości 10 gramów rozpuszczano w 256 ml mieszaniny acetonitrylu z wodą (55 : 45) i naniesiono z szybkością 3 ml/min. na kolumnę o wymiarach 5,5 x 85 cm, załadowaną żelem krzemionkowym zawieszonym w mieszaninie acetonitrylu z wodą (7 : 3). Eluowano mieszaniną acetonitrylu z wodą (7 : 3) z szybkością 5 ml/min. Frakcje, zawierające najwięcej antybiotyku, zatężono do sucha pod zmniejszonym ciśnieniem i liofilizowano.

Otrzymany w taki sposób materiał był mieszaniną soli jednoamonowych czynników I i II. Używano go zarówno do badania aktywności przeciwbakteryjnej i przeciwrakowej opisanego powyżej, jak też do prób rozdzielania i oczyszczania opisanych poniżej.

Przykład X. Rozdział soli jednoamonowych czynników I i II antybiotyku A16886.

10 gramów preparatu przygotowanego według przepisu z przykładu IX rozpuszczono w 197 ml mieszaniny acetonitrylu z wodą (55 : 45) i naniesiono z szybkością 1 ml/min., na kolumnę o wymiarach 4 x 130 cm, załadowaną 1,6 litra mikrokryształicznej celulozy (Avicel) zawieszanej w acetonitrylu z wodą (7 : 3). Eluowano mieszaniną acetonitrylu z wodą (7 : 3) z szybkością 2 ml/min. Odbierane frakcje kontrolowano chromatograficznie na bibule. Frakcje zawierające poszczególne czynniki zbierano osobno i liofilizowano.

Przykład XI. Otrzymywanie chlorowodoru antybiotyku A16886.

200 mg soli jednoamonowej antybiotyku A16886 przygotowanej w sposób opisany w poprzednich przykładach rozpuszczono w 2 ml wody. Początkową wartość pH roztworu wynoszącą 5,30 skorygowano 1N kwasem solnym do 2,0, a następnie roztwór zatężono pod zmniejszonym ciśnieniem prawie do sucha. Dodano 0,5 ml wody i 1,5 ml metanolu, a następnie strącono chlorowodorek antybiotyku dodatkiem 10 objętości acetonu. Wytrącony osad odsączono, przemyto acetonem i wysuszono. Analiza wykazała zawartość 4,50% chlorku. Miareczkowanie potencjometryczne w 66% roztworze wodnym dwumetyloformamidu przy początkowej wartości pH = 5,0 wykazało obecność trzech dających się miareczkować grup o $pK_{a1} = 3,6$; $pK_{a2} = 5,2$ i $pK_{a3} = 10,8$.

Przykład XII. Otrzymywanie soli dwusodowej antybiotyku A16886.

200 mg soli jednoamonowej antybiotyku A16886 otrzymanej w sposób opisany w poprzednich przykładach rozpuszczono w 2 ml wody, a wartość pH roztworu wynoszącą 5,30 skorygowano dodatkiem 2,5N wodorotlenku sodowego do 10,5. Roztwór wtedy natężono pod zmniejszonym ciśnieniem prawie do sucha, a następnie dodano 1,5 ml metanolu i wytrącono sól dodając 10 objętości acetonu. Osad odsączono, przemyto acetonem i wysuszono. Analiza wykazała zawartość 6,79% sodu.

Przykład XIII. Otrzymywanie antybiotyku A16886 w formie kwasowej.

200 mg mieszaniny soli jednoamonowych antybiotyku A16886 i A16886II rozpuszczono w 40 ml wody i dodano 6 ml wymieniacza jonowego Dowex 50W-X12 (forma H^+). Mieszano w ciągu 30 minut i sączono przez lejek z wkładką spiekaną średniej gęstości. Przesącz o wartości pH = 2,65 liofilizowano.

Miareczkowanie potencjometryczne w 66% roztworze wodnym dwumetyloformamidu wykazało obecność trzech dających się miareczkować grup o $pK_{a1} = 4,2$; $pK_{a2} = 5,6$ i $pK_{a3} = 10,4$.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowego antybiotyku A16886 lub jego dopuszczalnych w farmacji soli, z n a m i e n n y t y m, że szczep *Streptomyces clavuligerus* NRRL 35 85 hoduje się na pożywce, zawierającej przyswajalne źródła węgla, azotu i soli nieorganicznych, w hodowli głębinowej z napowietrzaniem, aż do otrzymania znacznych ilości antybiotyku A16886, po czym wyodrębnia się go w postaci kwasu lub w postaci soli, i ewentualnie sól antybiotyku A16886 rozdziela na czynniki A16886I i A16886II w postaci soli lub w postaci kwasów.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że fermentację prowadzi się w temperaturze 25–37°C w czasie 36–72 godzin.

T a b l i c a I

Obserwowane właściwości	Charakterystyka szczepu wytwarzającego antybiotyk A16886
Morfologia	Sporofory są wytwarzane na obficie rozgałęzionej grzybni powietrznej i składają się z siatki krótkich, sympodialnie rozgałęzionych strzępek. Zwykle wytwarzanych jest od 1 do 4 spor na krótkich maczugowatych gałązkach. Ewentualnie sporofory dzielą się tworząc łańcuszki zarodników. Wymiary spor wynoszą $0,34-0,85\mu \times 0,85-3,3\mu$, przeciętnie $0,64 \times 1,5\mu$. Fotografia w mikroskopie elektronowym wykazuje gładkościenne spory. Spory w grzybni podstawowej nie są wytwarzane.
Cechy hodowlane	
ISP nr 2 (agar z wyciągiem drożdżowym i słodowym)	Wzrost obfity, spód szarawo-żółty [12K3]; grzybnia powietrzna obfita, ciemnoszara (G) 3ih [21B1]; brak rozpuszczalnych pigmentów.
ISP nr 3 (agar z mąką owsianą)	Wzrost umiarkowany, spód bladożółty [11C1]; grzybnia powietrzna dość obfita, biała (W) b [27A1]; brak rozpuszczalnych pigmentów.
ISP nr 4 (agar ze skrobią i solami nieorganicznymi)	Wzrost obfity, spód szarawo-żółty 12B2; grzybnia powietrzna umiarkowana, średnio-szara (GY) 2fe [45A1]; brak rozpuszczalnych pigmentów.
ISP nr 5 (agar z gliceryną i asparaginą)	Wzrost dość obfity, spód bladożółto-zielony [10B1]; grzybnia powietrzna dość obfita biała (W) a; brak rozpuszczalnych pigmentów.
Agar z mąką owsianą i pastą pomidorową	Wzrost obfity, spód szarawo żółty [11E4]; grzybnia powietrzna umiarkowana, jasnoszarawo-oliwkowa (GN) 1-1/2ig [21B1]; brak rozpuszczalnych pigmentów.
Agar Emersona	Wzrost obfity, spód bladożółty [11C1]; grzybnia powietrzna uboga; brak rozpuszczalnych pigmentów.
Agar Bennetta	Wzrost obfity, spód jasnożółty [11J2]; grzybnia powietrzna obfita, ciemnoszarawo-zielona (GN) 24-1/2ih [23A3]; brak rozpuszczalnych pigmentów.
Agar Czapek'a	Wzrost ubogi
Agar glukozowo-asparagino- wy	Wzrost umiarkowany, spód bladożółto-zielony [10B1]; grzybnia powietrzna dość obfita, biała (W) b [27A1]; brak rozpuszczalnych pigmentów.
Agar tyrozynowy	Wzrost umiarkowany, spód bladożółty [10B2] grzybnia powietrzna umiarkowana, żółtawoszara (GY) 2dc [10A2]; brak rozpuszczalnych pigmentów.
Agar odżywczy (nutrient agar)	Wzrost dość obfity, spód bladożółto-zielony [10B1]; grzybnia powietrzna skąpa, biała; brak rozpuszczalnych pigmentów.
Jabłczan wapnia	Wzrost obfity, spód bladożółto-zielony [10B1]; grzybnia powietrzna dość obfita, biała (W) a.
Działanie na mleko	Nie powoduje koagulacji, mleko pozostaje klarowne w ciągu 17 dni.
Redukcja azotanów	Nie redukuje
Upłynnianie żelatyny	Nie upłynnia
Wpływ wartości pH na wzrost	Optymalny dla wzrostu zakres pH = 5,0-6,0, przy pH 7,5-8,5 - rośnie lecz nie sporuluje,

Wytwarzanie melaminy (pożywka zawierająca trypton i wyciąg drożdżowy oraz pepton-iron agar)	Nie wytwarza
Wymagania temperaturowe	Dobry wzrost i sporulacja w zakresie 26–30°C, brak przy 37°C i powyżej.
Główne składniki hydrolizatu całej komórki	Kwas L,L-dwuaminopimelinowy, gliceryna, kwas glutaminowy, kwas asparaginowy, alanina i leucyna.

T a b l i c a II

Wykorzystywanie źródeł węgla przez NRRL 3585

Związek	
L-arabinoza	—
ramnoza	—
fruktoza	—
D-ksyloza	—
melecytoza	(—)
rafinoza	—
dekstroza	—
cellobioza	—
maltoza	+
sacharoza	—
celuloza	—
inozytol	(+)
mannitol	—
Glutaminian sodowy	(+)

T a b l i c a III

Badany drobnoustrój	Stężenie hamujące mog/ml
<i>Escherichia coli</i> 0127	0,39 m.r.
<i>Proteus</i> PR-6	0,78 m.p.
<i>Salmonella typhimurium</i> S-4	0,78 m.p.
<i>Klebsiella</i> sp. K-1	1,56 m.p.
<i>Pseudomonas</i> sp. X239	ponad 100 m.p.
<i>Salmonella typhosa</i> T-63	0,78 m.r.
<i>Staphylococcus aureus</i> 3 055	25,00 m.p.
<i>Streptococcus pyogenes</i> C203	6,25 m.p.
<i>Bacillus subtilis</i> X12.1	1,56 m.p.
<i>Staphylococcus aureus</i> 3 150	50,00 m.p.

Tablica IV

Szczep	Czynnik I $\mu\text{g}/\text{krążek}$						Czynnik II $\mu\text{g}/\text{krążek}$					
	30	10	5	2.5	1.0	0.5	30	10	5	2.5	1.0	0.5
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Escherichia coli 0127	25.6	20.7	18.6	15.9	12.7	8.4	19.7	15.9	12.9	9.4	0	0
Escherichia coli EC 25	19.6	15.1	12.5	9.1	0	0	11.9	7.7	0	0	0	0
Proteus sp. PR6	23.2	19.0	16.7	13.6	9.9	0	22.2	16.7	13.6	10.4	0	0
Proteus sp. PR7	14.0	10.4	0	0	0	0	7.1	0	0	0	0	0
Salmonella typhosa SA 12	27.2	22.8	19.9	16.9	11.3	8.0	23.8	18.7	15.6	12.3	7.5	0
Salmonella typhosa SA 16	24.2	19.6	16.2	13.1	9.3	0	19.3	13.4	11.0	7.5	0	0
Klebsiella aerobacter KA 14	23.0	18.0	15.4	11.4	7.6	0	20.1	13.7	10.8	0	0	0
Klebsiella aerobacter KA 25	22.1	15.8	12.3	9.0	0	0	15.6	10.1	7.4	0	0	0
Pseudomonas sp. Ps 24	23.0	18.2	15.7	13.2	10.1	0	20.2	15.4	12.3*)	9.3*)	0	0
Pseudomonas sp. Ps 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Staphylococcus aureus 3055	0	0	0	0	0	0	12.4	0	0	0	0	0
Staphylococcus aureus 3074	0	0	0	0	0	0	10.1	0	0	0	0	0

*) łącznie z koloniami satelitarnymi

Tablica V

Drobnoustrój	ED ₅₀
Escherichia coli 0127	13.8
Salmonella typhosa T-63	15.6
Klebsiella K-1	10.2
Proteus PR-6	7.3

Tablica VI

Średnica stref zahamowania w mm

Stężenie	Cylinderki stalowe A		Krażki bibułowe B	
	E. amylovora	P. solanacearum	E. amylovora	P. solanacearum
A16 886 –				
10 części na milion	6–6	16–17	13–13	20–21
A16 886 –				
50 części na milion	12–14	25–25	16–17	30–30
A16 886 –				
100 części na milion	15–16	30–30	20–20	34–35
Kontrola				
(woda destylowana)	6–6	6–6	13–13	13–13

Tablica VII

Pseudomonas solanacearum
wyniki leczenia

Kontrola (1% etanolu + 0,1% środka powierzchniowo czynnego)	0	0
A16886 – 400 części na milion	2+	3+
A16886 – 200 części na milion	2+	2+

Tablica VIII

Pseudomonas glycinia wyniki leczenia

Kontrola	0
A16886 – 200 części na milion	3+
A16886 – 400 części na milion	2+

Tablica IX

Wyniki leczenia w poszczególnych grupach roślin

	zakażenie, później spryskiwanie	spryskiwanie później zakażenie
Kontrola (woda)	0	0
Kontrola (woda z dodatkiem mieszaniny emulgatorów)	0	0
A16886 – 100 części na milion	2	4
A16886 – 500 części na milion	3+	4

Tablica X

Pseudomonas solanacearum
wyniki leczenia
podawanie tylko do liści podawanie tylko do łodyg

Kontrola (woda z dodatkiem emulgatora)	0	1	0	1
A16886 – 100 części na milion	3	4	4	4
A16886 – 400 części na milion	4	4	4	4

Tablica XI

	Przeciętna ilość owsików u jednej myszy	
	<i>Aspicularis tetraptera</i>	<i>Syphacia obvelata</i>
Kontrola	35	41
Antybiotyk A16886 w dawce 500 mg/kg	4,5	0,5

Tablica XII

Grupa	Przeciętna ilość uszkodzeń płuc w jednej grupie
Kontrola	2,0
0,005% antybiotyku A16886	0,166
0,01 antybiotyku A16886	0,33
0,05% antybiotyku A16886	0,0

Tablica XIII

Grupa	Przeciętna ilość uszkodzeń płuc w jednej grupie
Kontrola	2,2
0,0005% antybiotyku A16886	1,2
0,001% antybiotyku A16886	0,7
0,1% antybiotyku A16886	0,2

Tablica XIV

Układ rozwijający	Wartość R _F	
	Czynnik I	Czynnik II
Chromatografia bibułowa		
Etanol, woda (80 : 20) z dodatkiem 1,5% chlorku sodowego, bibuła nasycona 1N siarczanem sodowym	0,38	0,33
Butanol wysycony wodą	0	0
Butanol wysycony wodą z dodatkiem 2% kwasu p-toluenosulfonowego	0,39	0,32
Keton metylowoizobutyłowy wysycony wodą	0	0
Keton metylowoizobutyłowy wysycony wodą z dodatkiem 2% kwasu p-toluenosulfonowego	0	0
Keton metylowoizobutyłowy wysycony wodą z dodatkiem 2% pirydyny	0	0
Acetonitryl	0	0
Propanol, acetonitryl, metanol, woda (4 : 3 : 2 : 1)	0	0
Propanol, pirydyna, kwas octowy, woda (15 : 10 : 3 : 12)	0,32	0,27

Propanol, pirydyna, kwas octowy, acetonitryl, woda (45 : 30 : 9 : 0 : 36)	0,24	0,15
Butanol, kwas octowy, woda (3 : 1 : 1P)	0,20	0,17
Octan etylu, kwas octowy, woda (3 : 1 : 1)	0,29	0,22
Propanol, woda (70 : 30)	0,17	0,17
Acetonitryl, woda (70 : 30)	0,72	0,65
Woda, etanol, kwas octowy (70 : 42 : 6)	0,82	0,82
Chromatografia cienkowarstwowa		
Acetonitryl, woda (7 : 3), na płytkach pokrytych celulozą	0,35	0,29

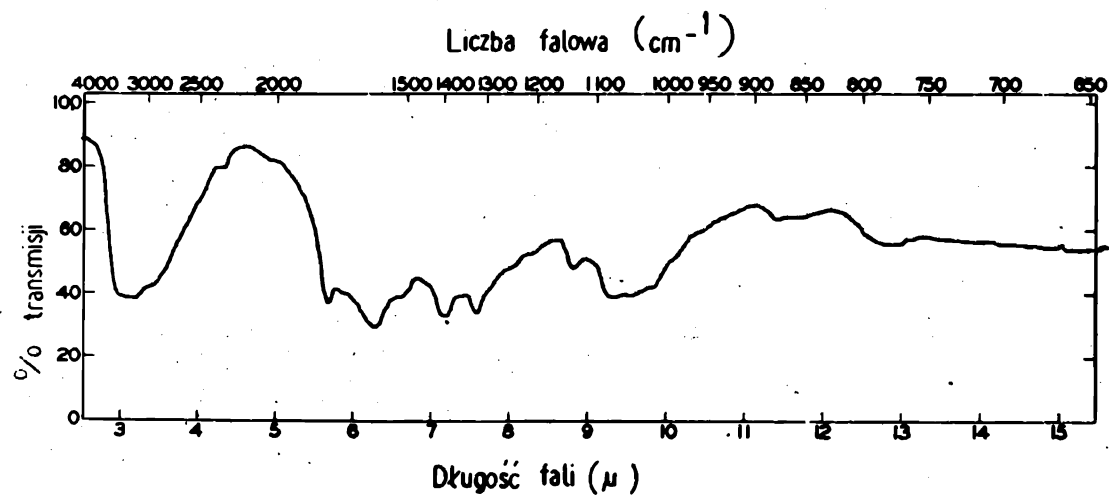


FIG. 1

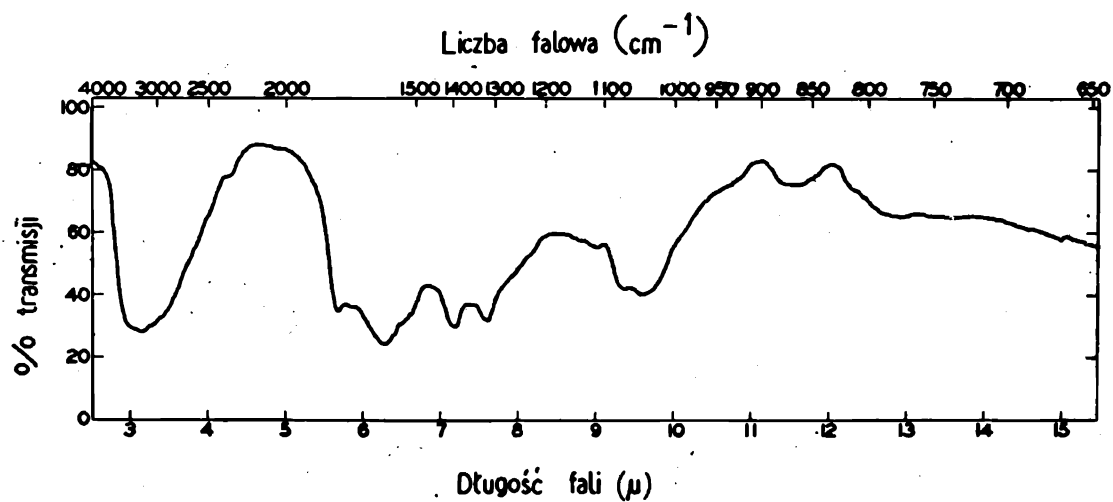


FIG. 2