

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

71107

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 19.08.1970 (P. 142 775)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 05.04.1973

Opis patentowy opublikowano: 15.07.1976

MKP C12d 9/14

Int. Cl.² C12D 9/14

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: _____

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

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku oraz jego soli

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowego antybiotyku A 16884 oraz jego soli.

Nowy antybiotyk A 16884 wytwarza się drogą fermentacji nieznanego dotychczas szczepu *Streptomyces lipmanii*, a sole tego antybiotyku wytwarza się poddając go reakcji z odpowiednim kwasem lub zasadą. Antybiotyk 16884 i jego sole wykazują działanie przeciwbakteryjne i przeciwoznaczycowe, przy czym działanie przeciwbakteryjne zachodzi zarówno wobec ustrojów Gram-ujemnych i Gram-dodatnich, jak i wobec ustrojów wywołujących choroby roślin.

Amonowa sól antybiotyku A 16884 jest białą amorficzną substancją ulegającą rozkładowi w temperaturze około 180°C, dobrze rozpuszczalną w wodzie, rozpuszczalną w dwumetylosulfotlenku, słabo rozpuszczalną w niższych alkanolach i nierozpuszczalną w acetonitrylu. Sól ta jest związkiem amfoterycznym o 4 dających się miareczkować grupach o $pK'a_1 = 3,9$, $pK'a_2 = 5,3$, $pK'a_3 = 9,2$ i $pK'a_4 = 10,5$ przy miareczkowaniu w 66% roztworze dwumetyloformamidu przy wyjściowej wartości pH = 5,8. Pozorny ciężar cząsteczkowy związku wynosi około 435 według danych z miareczkowania, w skład jego wchodzi 44,01% węgla, 5,73% wodoru, 10,65% azotu, 31,27% tlenu i 6,86% siarki, a jego optyczna skręcalność właściwa $[\alpha]_D^{25}$ wynosi +140,9° (c = 1% ciężar/objętość, w wodzie). Analiza widma absorpcyjnego w podczerwieni próbki zawiesiny związku w oleju mineralnym wykazuje następujące pasma: 3,18 (szerokie pasmo), 5,66; 6,26; 6,57; 6,89; 7,15; 7,28; 7,40; 7,73; 8,00; 8,14; 8,79; 9,24; 9,65; 9,79 i 10,40 mikronów. Badania soli na takie reagenty jak ninhydryna, Pan Dutscher, Benedict, Molisch, jod i chlorek dansylu dają wyniki dodatnie, podczas gdy badania na roztwór Fehlinga, chlorek żelazowy, biuret i Sakaguchi dają wyniki ujemne.

Sposób według wynalazku wytwarzania antybiotyku A 16884 i jego soli polega na tym, że hoduje się szczep *Streptomyces lipmanii* NRRL 3584 w pożywce zawierającej przyswajalne źródła węgla, azotu i soli nieorganicznych w warunkach aerobowych w zanurzeniu, do momentu wytworzenia odpowiedniej ilościżądanego antybiotyku. Antybiotyk A 16884 jest peptydem zawierającym siarkę, o cząsteczce amfoterycznej.

Podobnie do innych hodowli, fermentacja szczepu *Streptomyces lipmanii* powoduje wytworzenie się szeregu substancji antybiotykowych, z których jedną stanowi antybiotyk A 16884. Inne substancje są albo stosunkowo nietrwałe albo występują w bardzo małych ilościach.

Antybiotyk A 16884 stosuje się w postaci czystej lub w postaci soli, na przykład soli addycyjnej z kwasem albo soli z kationem. W przypadku soli z kationem może to być sól z jednym lub dwoma kationami. Często korzystnie jest wytwarzać sole bezpośrednio podczas etapu oczyszczania. Antybiotyk A 16884 został wyosobniony w postaci soli jednoamonowej i jako taki jest opisany poniżej.

Jednoamonowa sól antybiotyku A 16884 jest białą amorficzną stałą substancją, ulegającą rozkładowi w temperaturze około 180°C, dobrze rozpuszczalną w wodzie, rozpuszczalną w dwumetylosulfotlenku, słabo rozpuszczalną w niższych alkanolach i zasadniczo nierozpuszczalnymi w acetonitrylu i innych rozpuszczalnikach organicznych. Podana wyżej wartość optycznej skręcalności właściwej jednoamonowej soli antybiotyku A 16884 odnosi się do soli suszonej w ciągu około 15 godzin nad bezwodnym chlorkiem wapniowym w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego.

Elektrometryczne miareczkowanie jednoamonowej soli antybiotyku A 16884 w 66% wodnym roztworze dwumetyloformamidu przy wyjściowej wartości pH = 6,6 wykazuje obecność 4 grup: $pK'a_1 = 3,5$, $pK'a_2 = 5,2$; $pK'a_3 = 9,2$ i $pK'a_4 = 10,3$. Podobne miareczkowanie lecz przy wartości pH 5,8 wykazuje grupy: $pK'a_1 = 3,9$; $pK'a_2 = 5,3$; $pK'a_3 = 9,2$ i $pK'a_4 = 10,5$. Po przekształceniu jednoamonowej soli antybiotyku A 16884 w kwas, grupa $pK'a_2$ 9,2 znika. Ciężar cząsteczkowy soli jednoamonowej wynosi około 435.

Analiza pierwiastkowa jednoamonowej soli antybiotyku A 16884, wysuszonej nad pięciotlenkiem fosforu w temperaturze około 80°C pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego, wykazuje obecność 44,01% węgla, 5,73% wodoru, 10,65% azotu, 31,27% tlenu i 6,86% siarki. Zawartość grupy metoksylowej wynosi 6,64%, a acetylowej -9,23%. Próba Van Slyke'a na zawartość aminowego azotu wykazuje 5,09%.

Absorpcyjne widmo w podczerwieni próbki zawiesiny jednoamonowej soli antybiotyku A 16884 w oleju mineralnym przedstawiono na fig.1. Dostrzegalne pasma w zakresie 2,0–15,0 mikronów podano wyżej. Absorpcyjne widmo w nadfiolecie wodnego roztworu jednoamonowej soli antybiotyku A 16884 wykazuje szczyty absorpcyjne przy długości fali 242 milimikronów ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 126$) i przy 625 milimikronów ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 158$). Pomiarzy zjawiska Cottona w roztworze wodnym wykazują wartość dodatnią w pasmie 263 milimikronów, a ujemną – w pasmie 236 milimikronów.

Chromatografia bibułowa jednoamonowej soli antybiotyku A 16884 z zastosowaniem papierka Whatmana nr 1 daje wartość $R_f = 0,79$, przy czym jako rozpuszczalnik stosuje się mieszaninę propanolu, acetonitrylu i wody w stosunku objętościowym 1 : 1 : 1. Próbkę bioautograficzną otrzymuje się przez umieszczenie papierka chromatograficznego na płytkach agarowych usianych wrażliwymi ustrojami testowymi, takimi jak *Salmonella gallinarum*.

Widmo magnetycznego rezonansu jądrowego antybiotyku A 16884 w D₂O wykazuje następujące cechy: 5,15 części/milion (1H, singlet), 4,86, 4,68 części/milion (2H, AB kwartet, J = 12,5 c/s); 3,9–3,7 części/milion (1H, multiplet); 3,67, 3,29 części/milion (2H, AB kwartet, J = 18 c/s); 3,53 części/milion (3H, singlet); 2,6–2,3 (2H multiplet); 2,10 części/milion (3H, singlet); 2,1–1,6 części/milion (4H, multiplet).

Chromatografia bibułowa jednoamonowej soli antybiotyku A 16884 w innych rozpuszczalnikach daje następujące wyniki:

Rozpuszczalnik	Wartość R_f
Mieszanina etanolu z wodą w stosunku 80 : 20 z 1,5% chlorku sodowego; papierek nasycony 1 n siarczanem sodowym	0,58
Mieszanina metanolu, propanolu i wody w stosunku 6 : 2 : 1; papierek buforowany 0,75 m fosforanu potasowego; pH = 4,0	0,21
Mieszanina propanolu, pirydyny, kwasu octowego, acetonitrylu i wody w stosunku 45 : 30 : 9 : 40 : 36	0,40
Mieszanina III-rzęd. alkoholu amyloвого, acetonu i wody w stosunku 2 : 1 : 2	0,40
Mieszanina octanu etylu, kwasu octowego i wody w stosunku 3 : 1 : 1	0,36
Mieszanina ketonu metyloво-etyloвого i wody w stosunku 92 : 8; papierek buforowany 0,1 n octanem sodowym, pH 4,6	nieruchomy
Mieszanina propanolu z wodą w stosunku 70 : 30	0,30
Butanol nasycony wodą	nieruchomy
Butanol nasycony wodą z 2% kwasu p-tolueno-sulfonowego	0,60

Cienkowarstwowa chromatografia jednoamonowej soli A 16884 na płytkach żelu krzemionkowego w 70% wodnym roztworze acetonitrylu, z zastosowaniem ninhydryny jako detektora, wykazuje wartość R_f około 0,47, a na płytkach celulozowych w 70% wodnym roztworze acetonitrylu z tym samym detektorem wartość ta wynosi

0,45. Aminokwasowa analiza kwasowego hydrolizatu antybiotyku A 16884, prowadzona metodą Spackmana-Moore'a-Steina, wykazuje dwa szczyty reagujące z ninhydriną, z których jeden eluuje się identycznie z glicyną (0,758 mikromoli/mg, a drugi eluuje się tuż przed glicyną i identyfikuje jako kwas α -aminoadypinowy 2,39 mikromoli/mg. Podobna analiza późniejszej próbki daje odpowiednio 0,49 mikromoli/mg i 1,2 mikromoli/mg.

Przeprowadzono również szereg jakościowych badań chemicznych antybiotyku A 16884. Wartości dodatnie uzyskuje się podczas badań na takie reagenty jak ninhydrina, Pan Dutscher, Benedict, Molisch, jod i chlorek dansylu, a ujemne – wobec roztworu Fehlinga, chlorku żelazowego, biuretu i Skaguchi. Jednoamonowa sól antybiotyku A 16884 okazuje się trwała przy wartości pH = 3–9 w temperaturze 5°C w ciągu 8 dni, stosunkowo trwała przy wartości pH = 3–9 w temperaturze 25°C w ciągu 4 dni i nietrwała przy różnych wartościach pH w temperaturze 100°C w ciągu 5 minut. Aktywność biologiczna związku zanika powoli przy wartości pH = 3–9 w temperaturze 37°C, przy czym połowa tej aktywności zanika w ciągu 4 dni.

Antybiotyk A 16884 powstrzymuje rozwój bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Ilości częściowo oczyszczonej jednoamonowej soli antybiotyku A 16884 potrzebne do zahamowania wzrostu podanych przykładowo drobnoustrojów podano w tablicy 1. Ilości te określono metodą rozcieńczenia agarowego lub rozcieńczenia roztworem fermentacyjnym (oznaczonymi w tablicy 1 odpowiednio „r.a.” i „r.f.”). Podczas próby „r.a.” badany drobnoustrój rozprowadza się na płytkach agarowych zawierających różne ilości jednoamonowej soli antybiotyku A 16884, celem wyznaczenia minimalnej ilości antybiotyku w mcg/ml, potrzebnej do zahamowania wzrostu drobnoustroju w ciągu 48 godzin, a w przypadku drobnoustrojów wywołujących choroby roślin – w ciągu 72 godzin.

Podczas próby „r.f.” szereg probówek zawierających pożywkę z różnymi ilościami amonowej soli antybiotyku A 16884 zaszczepia się badanym drobnoustrojem, celem wyznaczenia minimalnej ilości antybiotyku w mcg/ml, potrzebnej do zahamowania wzrostu drobnoustroju w ciągu około 20 godzin.

Tablica 1

Nazwa drobnoustroju	Potrzebna ilość antybiotyku w mcg/ml
<i>Escherichia coli</i> EC 0127	6,25 r.a.
<i>Proteus</i> PR6	1,56 r.a.
<i>Salmonella typhimurium</i> 54	3,12 r.a.
<i>Salmonella typhosa</i> T63	1,56 r.a.
<i>Staphylococcus aureus</i> 3055	50,00 r.a.
<i>Staphylococcus aureus</i> 3150	50,00 r.a.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> X239	50,00 r.a.
<i>Salmonella flexneri</i> SH3	6,25 r.a.
<i>Klebsiella aerobacter</i> K1	6,25 r.a.
<i>Klebsiella aerobacter</i> KA14	1,56 r.a.
<i>Mycobacterium avium</i> X85	>50,00 r.a.
<i>Streptococcus pyogenes</i> 203	3,12 r.a.
<i>Bacillus subtilis</i> X12,1	3,12 r.a.
<i>Neurospora</i> sp. M 45–846	>50,00 r.a.
<i>Sarcina lutea</i> X186	6,25 r.a.
<i>Escherichia coli</i> ECO 127	7,80 r.f.
<i>Klebsiella aerobacter</i> KA 14	15,60 r.f.
<i>Salmonella typhosa</i>	31,20 r.f.

W żadnej z powyższych prób nie występuje wiązanie przez surowicę końską. Jak wynika z powyższej tablicy, jednoamonowa sól antybiotyku A 16884 wykazuje aktywność zarówno wobec Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych drobnoustrojów.

Dokładniej oczyszczoną jednoamonową sól antybiotyku A 16884 poddaje się dalszemu badaniu z zastosowaniem roztworu fermentacyjnego celem określenia jej aktywności przeciwbakteryjnej. W tablicy 2 podano wyniki tych badań, wyrażone jako minimalne ilości antybiotyku w mcg/ml, potrzebne do zahamowania wzrostu drobnoustroju.

Tablica 2

Nazwa drobnoustroju	Po 12 godzinach	Po 24 godzinach
<i>Streptococcus pyogenes</i> C 203	64	128
<i>Staphylococcus aureus</i> 3055	128	128
<i>Escherichia coli</i> EC 14	8	8
<i>Klebsiella aerobacter</i> KA 14	8	16
<i>Proteus</i> PR 6	★	8
<i>Proteus</i> PR 17	2	8
<i>Salmonella typhosa</i> SA 12	★	4
<i>Salmonella typhimurium</i> S 4	★	4
<i>Pasteurella multocida</i> P 3	★	2
<i>Shigella sonnia</i> I SH 10	★	16

★ — nie wykonano.

Antybiotyk A 16884 i jego sole wykazują również *in vivo* aktywność wobec wielu z powyższych drobnoustrojów, dzięki czemu mają zastosowanie do zwalczania infekcji u zwierząt. Skuteczna dawka ED_{50} częściowo oczyszczonej jednoamonowej soli antybiotyku A 16884 wynosi 23 mg/kg w przypadku myszy skażonych *Proteus* PR 6, a 33,8 mg/kg w przypadku myszy skażonych *Shigella* SH 3. Natomiast ED_{50} dokładnie oczyszczonej jednoamonowej soli antybiotyku A 16884 wynosi 3,64 mg/kg u myszy skażonych *Escherichia coli* EC 14, 23 mg/kg u myszy skażonych *Salmonella typhosa* SA 12 i 93,4 mg/kg w przypadku myszy skażonych *Klebsiella pneumoniae* K 1. Antybiotyk wprowadza się w każdym przypadku drogą podskórną.

Jak wspomniano wyżej, antybiotyk A 16884 i jego sole wykazują poza aktywnością przeciwbakteryjną aktywność przeciworobaczycową, dzięki czemu środki te mogą być podawane zwierzętom stałocieplnym w celu zwalczania rozmaitych pasożytów, a szczególnie robaków żołądkowych i jelitowych, takich jak *Ascaris lumbricoides* var. suum, *Nematospiroides dubius*, *Aspicularis tetraptera*, *Syphacia obvelata* i inne. Antybiotyki podaje się korzystnie doustnie, na przykład przez domieszanie do pokarmu zwierzęcego, w postaci tabletek, płynów itp. Na ogół, skuteczna pojedyncza dawka wynosi 1–500 mg antybiotyku na 1 kg lub więcej wagi ciała zwierzęcia. W przypadku stosowania antybiotyku A 16884 lub jego soli w postaci składnika normalnego pokarmu, dobre wyniki osiąga się stosując ilość 0,0001–0,05% antybiotyku w stosunku do wagi pokarmu, przy czym korzystną ilością jest zawartość w granicach 0,01–0,05%.

Przeciworobaczycową aktywność antybiotyku A 16884 ilustrują następujące doświadczenia. W pierwszym doświadczeniu jednoamonową sól antybiotyku A 16884 podaje się jednorazowo przez sondę dwóm myszom skażonym *Aspicularis tetraptera* i *Syphacia obvelata* (owsiki), przy czym stosuje się dawkę 500 mg soli na 1 kg wagi ciała myszy, zawieszoną w soli fizjologicznej zawierającej 0,125% metylocelulozy. Dla porównania stosuje się grupę kontrolną myszy skażonych *Aspicularis tetraptera* i *Syphacia obvelata*. Obie grupy przechowuje się w normalnych warunkach laboratoryjnych w ciągu 48 godzin od momentu podania antybiotyku, po czym uśmierca się wszystkie myszy i bada na obecność owsików. Wyniki badań podano w tablicy 3.

Tablica 3

	Liczba owsików na 1 mysz	
	<i>Aspicularis</i> tetraptera	<i>Syphacia</i> obvelata
Grupa kontrolna	26	52
Jednoamonowa sól antybiotyku A 16884 w dawce 500 mg/kg	0	2,5

W drugim doświadczeniu jednoamonową sól antybiotyku A 16884 miesza się z 3 porcjami typowego pokarmu dla myszy w ilości po 0,005, 0,01 i 0,05% antybiotyku w stosunku do wagi pokarmu i porcjami tymi karmi się oddzielne grupy, po 5 myszy każda. Po upływie około 24 godzin po rozpoczęciu karmienia poddaje się myszy skażeniu *Ascaris lumbricoides* var. suum ova. Oddzielnej, kontrolnej grupie 5 myszy podaje się pokarm nie zawierający antybiotyku i zakaża się zwierzęta w tym samym czasie tym samym drobnoustrojem. Wszystkie myszy karmi się w warunkach laboratoryjnych w ciągu 10 dni, po czym odsuwa się pokarm, a jedenastego dnia uśmierca się zwierzęta i poddaje ich płuca badaniu na obecność zmian wywołanych przez *Ascaris lumbricoides* var. suum.

W tablicy 4 podano zawartość jednoamonowej soli antybiotyku A 16884 w pokarmie i przeciętną liczbę uszkodzeń w płucach jednego zwierzęcia każdej grupy.

Tablica 4

Grupa	Przeciętna liczba uszkodzeń płuc
Kontrolna	2,2
Zawartość antybiotyku 0,005%	0,5
Zawartość antybiotyku 0,01%	0,4
Zawartość antybiotyku 0,05%	0,4

Antybiotyk A 16884 wytwarza się przez hodowanie nowoodkrytego, nigdzie dotychczas nie opisanego szczepu drobnoustroju, wyosobnionego z próbek gleby południowo-amerykańskiej.

Ustrój ten wyosobniono z próbek gleby przez zawieszenie porcji tych próbek w sterylnej wodzie destylowanej, a następnie natryskanie otrzymaną zawiesiną płytek agarowych, które poddaje się kilkudniowej inkubacji w temperaturze około 25–35°C. Po zakończeniu okresu inkubacyjnego, za pomocą sterylnej pętli platynowej przenosi się A 16884 – twórczy drobnoustroj na skosy agarowe, które poddaje się inkubacji, celem wytworzenia odpowiedniej ilości szczepionki do produkcji antybiotyku A 16884.

Stosowane do wyrobu antybiotyku A 16884 promieniowce zidentyfikowano metodą Waksmana i Curtisa jako szczep *Streptomyces lipmanii*. Nowy drobnoustroj, stosowany do wytwarzania antybiotyku A 16884, umieszczono w stałym depozycie w zbiorze Northern Utilization Research and Development Division, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture (poprzednio Northern Regional Research Laboratories) w Peorii, Illinois 61604, gdzie jest dostępny bez ograniczeń pod numerem NRRL 3584. Charakterystykę *Streptomyces lipmanii* NRRL3584 podano w tablicach 5 i 6. Do opracowania tej charakterystyki zastosowano metody zalecane przez International Streptomyces Project [Shirling i inni – „Methods for Characterization of Streptomyces Species”, w Inter. Bull. Systematic Bacteriol. 16, str. 313–340 (1966)] wraz z pewnymi dodatkowymi testami. Nazwy barw określono metodą ISCC-NBS, opisaną przez Kelly’ego i innych w The ISCC-NBS Method of Designating Colors and a Dictionary of Color Names (U.S. Department of Commerce Circ. 553, Washington, D.C. 1955). Oznaczenia w nawiasach odnoszą się do szeregu barw Tresnera i Backusa [Tresner i in. „System of Color Wheels for Streptomyces Taxonomy”, w Appl. Microbiol. 11, str. 335–338 (1963)], a oznaczenia kolorów są podkreślone. Bloki barw Maerza i Paula (Maerz i inni, Dictionary of Color, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, 1950) zamknięto w nawiasach kwadratowych. O ile nie zaznaczono inaczej, hodowlę prowadzono w temperaturze 30°C w ciągu 14 dni.

Tablica 5

Morfologia	Sporofory są zwykle proste, do krętych z nielicznymi haczykami; zarodniki krótkie o kształcie cylindrycznym i wymiarach 0,5–1,5μ×1,0–2,5μ występują zwykle w łańcuchach po 3–10, niekiedy po 10–50. Pod mikroskopem okazują się mieć gładką powierzchnię.
Charakterystyka na pożywce: ISP 2 (drożdże i agar z ekstraktu słodowego)	Wzrost umiarkowany, odwrotny ciemnoszarawy brunat [8H9]; grzybnia powietrzna bladożółta (Y) 2db.
ISP 3 (agar owsiany)	Wzrost umiarkowany, odwrotna ciemnoszarawa żółcień [13E4]; grzybnia powietrzna umiarkowana, biała (W) 13ba do bladożółtej (Y) 2db.
ISP 4 (sole nieorganiczne i rozpuszczalny agar skrobiowy)	Wzrost umiarkowany, odwrotna brunatnawa szarzeń [7C7]; grzybnia powietrzna umiarkowana, bladożółta (Y) 2db.
ISP 5 (gliceryna i agar asparaginowy)	Wzrost obfity, odwrotny jasnożółtawy brunat [1317]; grzybnia powietrzna obfita, szarawo-żółtawy-róż (R) 5dc.
Pasta pomidorowa i agar owsiany	Wzrost liczny, odwrotny szarawo-żółtawy-brunat [15E8]; grzybnia powietrzna obfita, żółtawo-szara (GY) 2dc.

Agar Emersona	Wzrost umiarkowany, odwrotny ciemno-szarawo- -żółtawy-brunat [8E9]; grzybni powietrznej i zarodników brak.
Agar Bennetta	Wzrost obfity, odwrotny średnio-żółtawy-brunat [14E7]; grzybnia powietrzna obfita, szarawo- -żółta (R) 3ec.
Agar Czapka	Wzrost słaby, biały; skąpa grzybnia powietrzna (W) 13ba.
Glukoza – agar asparaginowy	Wzrost obfity, odwrotna szarawa-żółcień [12D4]; grzybnia powietrzna obfita, żółtawo- -szara (GY) 2dc.
Agar tyrozynowy	Wzrost umiarkowany, odwrotny jasnożółtawy- brunat [12C5]; grzybnia powietrzna obfita, szarawo-żółta (R) 3ec.
Agar odżywczy	Wzrost umiarkowany, odwrotna jasna żółcień [11C1]; grzybni powietrznej brak.
Agar z maleinianu wapniowego	Wzrost umiarkowany, odwrotna czerń [56C1]; bardzo skąpa grzybnia powietrzna.

Fizjologia

Działanie na mleko	Koagulacja, peptonizacja
Redukcja azotanów	Dodatnia
Produkcja melaniny:	
agar peptonowo-żelazowy	Ujemna
trypton-ekstrakt drożdżowy	Ujemna
Warunki cieplne na pożywce z pasty pomidorowej i agaru owsianego	Obfity wzrost i zarodnikowanie w temperaturze 26°C i 30°C; słaby wzrost w temperaturze 37°C; brak wzrostu w temperaturze 43°C.
Reakcja barwy na zmianę wartości pH	Brunatnawa szarzeń zmienia się w czerwień
0,05 n HCl	
0,05 n NaOH	Bez zmian
Skrapianie żelatyny	100%.

W tablicy 6 podano wyniki przeprowadzonych na drobnoustroju NRRL 3584 prób na wykorzystanie węgla, przy czym

- + oznacza wzrost i wykorzystanie węgla
- oznacza brak wzrostu i wykorzystania węgla.

Tablica 6
Wykorzystanie węgla przez NRRL 3584

Związek	Wzrost
L – arabinoza	–
sacharoza	–
D-ksyloza	+
D-fruktoza	–
glukoza	+
ramnoza	–
rafinoza	–
i-inozyt	–
D-mannit	–
kontrolny (bez węgla)	–

Jak podano wyżej, antybiotyk A 16884 wytwarza się przez hodowanie drobnoustroju NRRL 3584. Jako pożywkę stosuje się którąkolwiek z kilku substancji dzięki temu, że, jak wynika z powyższych badań, ustrój jest zdolny do wykorzystywania różnych źródeł energii. Ze względu na koszt produkcji, maksymalną wydajność procesu oraz łatwość wyosabniania antybiotyku, stosuje się korzystnie pewne stosunkowo proste pożywki, a więc przyswajalne źródła węgla, takie jak glukoza, skrobia, gliceryna, melasa, dekstryna i inne, spośród których najkorzystniej stosuje się glukozę, oraz źródła przyswajalnego azotu, takie jak mączka sojowa, stałe substancje z wyciągu kukurydzy, drożdże, mączka z nasion bawełny, ekstrakt wołowy, peptony (mięsne lub sojowe), kazeina, mieszaniny aminokwasów itp., przy czym korzystnie stosuje się peptony, mączkę sojową, mieszaniny aminokwasów itp. Pożywka może zawierać odżywcze sole nieorganiczne zdolne do oddawania jonów sodowych, potasowych, amonowych, wapniowych, fosforanowych, siarczanowych, chlorkowych, węglanowych itp.

Pożywka może również zawierać niewielkie ilości innych pierwiastków potrzebnych do osiągnięcia optymalnego wzrostu i rozwoju drobnoustroju stosowanego do produkcji antybiotyku A 16884. Pierwiastki te występują zwykle jako odpowiednie domieszki w innych składnikach pożywki. Wyjściowa wartość pH pożywki może być różna, przy czym stwierdzono, że korzystnie winna ona wynosić 6,5–7,2. Jak zaobserwowano, w przypadku innych promieniowców wartość pH pożywki wzrasta stopniowo w miarę wzrostu ustroju i wytwarzania antybiotyku, osiągając poziom 6,7–7,5 lub wyższy, przy czym końcowa wartość pH zależy przynajmniej częściowo od wartości wyjściowej, substancji buforowych w pożywce oraz czasu wzrostu drobnoustroju.

Antybiotyk A 16884 wytwarza się w zanieczyszczeniu w warunkach aerobowych. Do wytwarzania stosunkowo małych ilości antybiotyku stosuje się powierzchniową hodowlę wstrząsaną w butelkach, natomiast do produkcji dużych ilości tego środka stosuje się korzystnie aerobową hodowlę w sterylnych zbiornikach. Pożywkę w sterylnym zbiorniku można zaszczerpić zawiesiną z zarodnikami; jednak ze względu na opóźnienie wzrostu jakie następuje w takim przypadku, korzystnie stosuje się hodowlę wegetatywną, która zapewnia bardziej efektywne wykorzystanie urządzeń do fermentacji. Korzystnie zatem najpierw wytwarza się wegetatywną szczepionkę ustroju przez zaszczerpienie stosunkowo niewielkiej ilości pożywki jego zarodnikami, a następnie przenosi się młodą aktywną wegetatywną szczepionkę do dużego zbiornika, zachowując warunki aseptyczne. Jako pożywkę, w której wytwarza się wegetatywną szczepionkę stosuje się tę samą lub różną pożywkę od tej, którą stosuje się do przemysłowej produkcji antybiotyku A 16884. Ustrój, z którego otrzymuje się antybiotyk A 16884 wzrasta w temperaturze 25–37°C, przy czym optymalne warunki występują w temperaturze 26–30°C. Maksymalną produkcję antybiotyku osiąga się na ogół w okresie 36–72 godzin po zaszczerpieniu pożywki.

Jak zwykle w procesach, prowadzonych w warunkach aerobowych, przez pożywkę przepuszcza się sterylne powietrze, przy czym dla efektywnego wzrostu ustroju i wydajnej produkcji antybiotyku A 16884, stosuje się 0,2–0,4, korzystnie 0,40 objętości powietrza na minutę w stosunku do objętości pożywki. Stopień aktywności antybiotykowej w pożywce daje się łatwo śledzić podczas fermentacji przez poddawanie próbek pożywki badaniom na hamowanie wzrostu ustrojów, który to wzrost, jak wiadomo, jest hamowany przez obecność antybiotyku A 16884. Jako testowe ustroje stosuje się korzystnie *Sarcina lutea* i *Salmonella gallinarum*, a badania próbek prowadzi się znanymi metodami: turbidometryczną lub płytkową. Na ogół, maksymalną produkcję antybiotyku A 16884 osiąga się w ciągu 1–3 dni po zaszczerpieniu pożywki w zanurzonej hodowli aerobowej lub w hodowli wstrząsanej.

Stosowane metody wyosabniania antybiotyku z aktywnego roztworu zapewniają maksymalne odzyskanie tego środka. Grzybnie i nierozpuszczone substancje stałe usuwa się z roztworu fermentacyjnego np. przez odsączenie lub odwirowanie, a następnie wyosabnia się antybiotyk A 16884 przez ekstrahowanie lub adsorbowanie.

W przypadku wyosabniania antybiotyku A 16884 drogą adsorbowania, stosuje się odpowiednie adsorbenty, takie jak węgiel, żel krzemionkowy, tlenek glinowy oraz żywice jonitowe. W zależności od warunków fermentacji, antybiotyk A 16884 wytwarza się w postaci amfoterycznej lub w postaci soli. Niezależnie od postaci, w jakiej występuje, antybiotyk ten adsorbuje się na jednym ze wspomnianych wyżej lub podobnych adsorbentów z roztworu w odpowiednim rozpuszczalniku. Adsorbowany antybiotyk A 16884 lub jego sól eluuje się z adsorbentu, na przykład przez spłukanie adsorbentu rozpuszczalnikiem. Stosując do takiego płukania roztwór mrówczanu amonowego lub octanu sodowego, otrzymuje się odpowiednio amonową lub sodową sól antybiotyku A 16884. Sole te dają się łatwo przekształcać z powrotem w antybiotyk A 16884 przez zastosowanie znanych metod. W procesie wyosabniania antybiotyku jako adsorbent można również stosować mikrokryształiczną celulozę.

Sole antybiotyku A 16884, poza solą amonową i solą z metalem alkalicznym, wytwarza się korzystnie przez poddanie reakcji antybiotyku A 16884 w postaci amfoterycznej z odpowiednim kwasem lub zasadą. W celu wytworzenia soli addycyjnej poddaje się antybiotyk A 16884 reakcji z kwasem nieorganicznym lub organicznym, takim jak kwas solny, bromowodorowy, jodowodorowy, siarkowy, fosforowy, octowy, benzoesowy, amidosulfonowy, winowy, cytrynowy, maleinowy, bursztynowy, askorbinowy i glikolowy.

Antybiotyk A 16884 tworzy również sole z kationami w wyniku reakcji amfoterycznej postaci tego antybiotyku z nieorganicznymi i organicznymi zasadami i solami. Przykładami takich soli są sole amonowe, podstawione sole amonowe, sole z metalami alkalicznymi, takimi jak sód, potas, lit, cez i rubid, sole z metalami ziem alkalicznych, takimi jak wapń, stront i bar oraz sole z innymi metalami, takimi jak glin, miedź, cynk, magnez i srebro. W przypadku zasad organicznych, na ogół korzystnie stosuje się wodne roztwory zasad o wartości $\text{pH} = 3,0$ lub wyższej. Odpowiednimi zasadami organicznymi są benzyloamina, metyloamina, dwumetyloamina, trójetyloamina, prokaina, dwuizopropyloamina, etanoloamina, cykloheksyloamina, dwucykloheksyloamina, dwufenyloamina, dwu-n-butyloamina, chinolina i pirydyloamina.

W zasadzie korzystnie stosuje się farmaceutycznie dopuszczalne sole antybiotyku A 16884; wszystkie jednak sole nadają się do stosowania jako związki pośrednie do wytwarzania, wyosabniania i oczyszczania antybiotyku A 16884. Do celów terapeutycznych, kationowe lub anionowe farmaceutycznie dopuszczalne sole są zasadniczo równoważne antybiotykowi A 16884; ze względu jednak na szczególne właściwości, takie jak rozpuszczalność, determinowane przez resztę solotwórczą, pewne sole są niekiedy korzystniejsze od innych. Poniższe przykłady objaśniają sposób według wynalazku.

P r z y k ł a d I. Wytwarzanie antybiotyku A 16884 metodą hodowli wstrząsanej.

Zarodnikową kulturę *Streptomyces lipmanii* NRRL 3584 wytwarza się hodując ustrój na skosach agaru odżywczego o następującym składzie:

dekstryna	10,00 g
ekstrakt drożdżowy	1,00 g
hydrolizowana kazeina („N-Z amina-typ A”, Sheffield Chemical Company)	2,00 g
ekstrakt wołowy	1,00 g
agar morski	20,00 g
zdejonizowana woda	1 litr

Przez dodanie wodorotlenku sodowego doprowadza się wartość pH pożywki do 7,0. Po zaszczepieniu skosów agarowych zarodnikami *Streptomyces lipmanii* NRRL 3584, inkubuje się je w ciągu 6 dni w temperaturze 30°C , a następnie pokrywa sterylną wodą destylowaną i łagodnie zdejmuje powstałą wodną zawiesinę zarodników i komórek. 1 ml otrzymanej zawiesiny zaszczepia się każdą ze 100 ml porcją pożywki wegetatywnej zawierającej:

glukozy	15,00 g
mączki sojowej	15,00 g
stałych substancji z wyciągu kukurydzy	5,00 g
węglanu wapniowego	2,00 g
chlorku sodowego	5,00 g
zdejonizowanej wody	1 litr

Wartość pH pożywki doprowadza się do 6,7 przez dodanie wodorotlenku sodowego.

Szczepionkę wegetatywną wstrząsa się w ciągu 36 godzin w temperaturze 30°C na wstrząsarce zwrotnej o skoku 5 cm i prędkości 108 skoków/minutę. Wytworzoną szczepionkę wykorzystuje się następnie do produkcji antybiotyku A 16884 jak następuje. Wytwarza się pożywkę o następującym składzie:

mączka sojowa	15,00 g
kazeina	1,00 g
azotan sodowy	3,00 g
syrop glukozowy (50% glukozy)	20,00 g
woda wodociągowa	1 litr

Porcje po 100 ml tej pożywki umieszcza się w 500 ml kolbach Erlenmeyera, które sterylizuje się w ciągu 30 minut w temperaturze 120°C . Po ochłodzeniu zaszczepia się każdą kolbę 5% szczepionki wegetatywnej i wstrząsa w ciągu 72 godzin w temperaturze 30°C na wstrząsarce obrotowej o prędkości 250 obrotów/minutę. Podczas fermentacji przez pożywkę przepuszcza się sterylne powietrze z prędkością 0,4 obj./min. Wyosobnienie antybiotyku przeprowadza się jak opisano w przykładzie VIII.

P r z y k ł a d II. Antybiotyk A 16884 wytwarza się postępując, jak w przykładzie I, lecz z zastosowaniem pożywki o następującym składzie:

rozpuszczalne substancje gorzelnicze (Nadrisol)	5,00 g
mączka sojowa (Nutrisoy 200 D)	5,00 g
mączka arachidowa	5,00 g
końcowy melas z trzciny cukrowej	5,00 g
owsianka	5,00 g
gliceryna	10,00 g
woda wodociągowa	1 litr

oraz z zastosowaniem wstrząsarki zwrotnej o prędkości 108 skoków na minutę zamiast wstrząsarki obrotowej.

Przykład III. Antybiotyk A 16884 wytwarza się postępując jak w przykładzie I, lecz z zastosowaniem pożywki o następującym składzie:

owsianka	20,00 g
gliceryna	10,00 g
woda wodociągowa	1 litr

Przykład IV. Antybiotyk A 16884 wytwarza się postępując jak w przykładzie 1, lecz z zastosowaniem pożywki o następującym składzie:

mączka z nasion bawełny	20,00 g
gliceryna	10,00 g
glukoza	5,00 g
woda wodociągowa	1 litr

Przykład V. Antybiotyk A 16884 wytwarza się postępując jak w przykładzie I, lecz z zastosowaniem pożywki o następującym składzie:

glukoza	20,00 g
rozpuszczalna skrobia	10,00 g
pepton (Wilson 159)	30,00 g
hydrolizowana kazeina („N-Z amina- -typ A”, Sheffield Chemical Co.)	4,00 g
siedmiowodzian siarczanu magnezowego	5,00 g
węglan sodowy	2,00 g
woda wodociągowa	1100 ml

Przykład VI. Inną zarodnikowaną kulturę *Streptomyces lipmanii* NRRL 3584 wytwarza się hodując ustrój na skosach odżywczego agaru o następującym składzie:

dekstryna	10,00 g
mączka z nasion bawełny	10,00 g
ekstrakt drożdżowy	1,00 g
agar morski	25,00 g
zdejonizowana woda	1000 ml

Wartość pH pożywki doprowadza się do 7,0 przez dodanie wodorotlenku sodowego. Po zaszczepieniu skosów agarowych zarodnikami *Streptomyces lipmanii* NRRL 3584, inkubuje się je w ciągu 7 dni w temperaturze 30°C, a następnie zeskrobuje z nich zarodniki, które łączy się z 2,0 ml sterylnej surowicy wołowej. 0,1 ml otrzymanej zawiesiny umieszcza się w sterylnej liofilnej probówce i liofilizuje w postaci pastylek. Wytworzonymi liofilizowanymi pastylkami zaszczepia się wegetatywną pożywkę o następującym składzie:

glukoza	5,00 g
dekstryna	10,00 g
bakto-trypton	5,00 g
ekstrakt drożdżowy	5,00 g
siedmiowodzian siarczanu-magnezowego	2,00 g
zdejonizowana woda	1 litr

Wartość pH pożywki pozostawia się na poziomie 6,7.

Przykład VII. Wytwarzanie antybiotyku A 16884 w zakładzie doświadczalnym.

Do 40-litrowej kadzi fermentacyjnej ze stali nierdzewnej wprowadza się 24 litry pożywki o następującym składzie:

Antifoam A (środek przeciw- pniący, Dow Corning)	0,20 g
glukoza	5,00 g
dekstryna 700	50,00 g
kaszka sojowa	25,00 g
końcowy melas z trzciny cukrowej	3,00 g
wodorofosforan potasowy	0,25 g
węglan wapniowy	2,50 g
zimna woda wodociągowa	do 25 litrów

Wartość pH utrzymuje się na poziomie 6,5. Pożywkę tę sterylizuje się w ciągu 30 minut w temperaturze 120°C, po czym ochładza się ją i zaszczenia 5% wegetatywnej pożywki wytworzonej jak podano w przykładzie VI. Fermentację prowadzi się w temperaturze 30°C w ciągu 66 godzin, wprowadzając sterylne powietrze z prędkością 0,35 obj./min. i mieszając pożywkę mieszadłem mechanicznym z prędkością 420 obr./min. Końcowa wartość pH wynosi 7,5. Antybiotyk A 16884 wyosabnia się jak opisano w przykładzie VIII.

P r z y k ł a d VIII. Wyosabnianie surowego antybiotyku A 16884 w postaci soli jednoamonowej.

Około 60 litrów roztworu fermentacyjnego wytworzonego w przykładzie VII filtruje się przez Hyflo Super-cel (diatomit sprzedawany przez Johns Manville Products Corporation), po czym przepuszcza się przez kolumnę węglową o wymiarach 9,6X150 cm (Pittsburgh Cal., 12X40, sprzedawana przez Pittsburgh Activated Carbon Co.). Kolumnę płucze się wodą, aż do uzyskania bezbarwnego odcieku, a substancję aktywną adsorbowaną na węglu usuwa się przepuszczając przez kolumnę 50% wodnego roztworu acetonu. Po połączeniu frakcji aktywnych stęży się je pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego w celu usunięcia acetonu, wprowadza do kolumny o wymiarach 5,9X104 cm wypełnionej żywicą IRA-68 (żywica anionitowa sprzedawana przez Rohm and Haas Co.) i przemywa kwasem mrówkowym. Następnie przemywa się kolumnę wodą do uzyskania czystego bezbarwnego odcieku i usuwa się substancje aktywne przez przemycie 0,1 m roztworu mrówczanu amonowego. Połączone frakcje aktywne przepuszcza się przez kolumnę węglową (Pittsburgh 12X40) o wymiarach 4,3X72 cm, po czym płucze się tę kolumnę sześciokrotnie większą od niej objętością wody, a substancje aktywne eluuje 30% wodnym roztworem acetonitrylu. Po połączeniu frakcji aktywnych, stężeniu ich pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego w celu usunięcia acetonitrylu i liofilizowaniu, otrzymuje się 25–30 g stałej substancji.

Substancję tę rozpuszcza się w minimalnej ilości wody i przepuszcza przez kolumnę o wymiarach 7,2X60 cm, wypełnioną mikrokryształiczną celulozą (Avicel, FMC Corporation), a następnie zawiesza w 70% wodnym roztworze acetonitrylu i płucze acetonitrylem. Po dodaniu próbki aktywnej płucze się kolumnę równoobjętościową ilością acetonitrylu i eluuje substancje aktywne metanolem, a po połączeniu frakcji aktywnych i stężeniu ich do objętości około 200 ml, wytrąca się substancję aktywną przez dodanie 10 objętości acetonu. Po przesączeniu osadu, wypłukaniu go acetonem i wysuszeniu pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego, otrzymuje się 9–12 g produktu.

20 g tego produktu rozpuszcza się w minimalnej ilości wody i przepuszcza przez kolumnę żelu krzemionkowego o wymiarach 7,2X60 cm. Przed wypełnieniem kolumny, żel krzemionkowy (Grade 950, Davison Chemical) płucze się wodą, a następnie metanolem i zawiesza w 70% roztworze acetonitrylu. Po wprowadzeniu próbki aktywnej płucze się kolumnę równoobjętościową ilością acetonitrylu i eluuje substancję aktywną 70% roztworem acetonitrylu. Najaktywniejsze frakcje łączy się, zateża do sucha pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego i rozpuszcza w metanolu, a substancję aktywną wytrąca się 10 objętościami acetonu. Po odsączeniu osadu, przemyciu go acetonem i wysuszeniu pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego, otrzymuje się 8 g produktu. Z frakcji o mniejszej aktywności otrzymuje się dalsze 6 g tego produktu.

P r z y k ł a d IX. Oczyszczanie jednoamonowej soli antybiotyku A 16884.

W 4 ml wody rozpuszcza się 1 g liofilizowanego produktu z przykładu VIII i przepuszcza roztwór przez kolumnę o wymiarach 2X60 cm, wypełnioną 175 ml żelu krzemionkowego Grade 950 w 80% wodnym roztworze acetonitrylu, po czym eluuje się kolumnę mieszaniną acetonitrylu z wodą w stosunku 4 : 1 i przeprowadza analizę chemiczną i chromatografię bibułową. W wyniku eluowania kolumny otrzymuje się wiele frakcji. Frakcje zawierające jednoamonową sól antybiotyku A 16884 łączy się, zateża do sucha, rozpuszcza w niewielkiej ilości dwumetylosulfotlenku, a następnie w kilku mililitrach etanolu, a substancję aktywną wytrąca się przez dodanie nadmiaru eteru. Po odwirowaniu osadu i wysuszeniu go pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego, otrzymuje się 91 mg jednoamonowej soli antybiotyku A 16884.

P r z y k ł a d X. Wytwarzanie antybiotyku A 16884 w postaci kwasu.

W 30 ml wody rozpuszcza się 200 mg jednoamonowej soli antybiotyku A 16884, po czym dodaje się do tego roztworu 6 ml żywicy Dowex 50X12 H+ (Dow Chemical Co.) i miesza się mieszaninę w ciągu 30 minut. Po odsączeniu płucze się żywicę na filtrze wodą i łączy przesącze, których wartość pH wynosi 2,7. Następnie

zateża się przesącze pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego do objętości około 1 ml, dodaje 4 ml metanolu i wytrąca kwas przez dodanie 40 ml acetonu. Po odwirowaniu osadu i wysuszeniu go pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego, otrzymuje się 35 mg antybiotyku A 16884 w postaci kwasu. Podczas miareczkowania w 66% roztworze dwumetyloformamidu przy wyjściowej wartości $\text{pH} = 4,5$, wartości $\text{pK}'\text{a}$ wynoszą 3,5, 5,2 i 10,3.

W około 2 ml wody rozpuszcza się 180 mg jednoamonowej soli A 16884 i doprowadza wartość pH do 10 przez dodanie 1 n roztworu wodorotlenku sodowego. Następnie zateża się roztwór pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego do małej objętości, po czym dodaje się 4 ml metanolu, wytrąca sól dwusodową przez dodanie 40 ml acetonu, odwirowuje ją i suszy pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego. Podczas miareczkowania w 66% roztworze dwumetyloformamidu przy wyjściowej wartości $\text{pH} = 10,4$, wartości $\text{pK}'\text{a}$ wynoszą 3,9, 5,2 i 10,5, a absorpcyjna analiza atomowa wykazuje zawartość 6% sodu.

P r z y k ł a d XI. Wytwarzanie chlorowodoru antybiotyku A 16884.

W 2 ml wody rozpuszcza się 200 mg jednoamonowej soli antybiotyku A 16884, po czym doprowadza się wartość pH do 2,0 przez dodanie 1 n kwasu solnego. Następnie rozcieńcza się mieszaninę reakcyjną 5,0 ml metanolu i przez dodanie 50 ml acetonu wytrąca się żądany chlorowodorek antybiotyku A 16884, który odwirowuje się, przemywa acetonem i suszy pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego. Analiza produktu wykazuje obecność 5,74% chloru, a elektrometryczne miareczkowanie w 66% roztworze dwumetyloformamidu przy wyjściowej wartości $\text{pH} = 5,0$ wykazuje miareczkowalne grupy 3,9, 5,2 i 10,4.

P r z y k ł a d XII. Wyosabnianie surowego antybiotyku A 16884 w postaci soli jednosodowej.

Około 60 litrów roztworu fermentacyjnego z przykładu VII przesącza się przez Hyflo-Super-cel, a przesącz przepuszcza przez 9,6X150 cm kolumnę węgla (Pittsburgh Cal. 12X40). Następnie przemywa się kolumnę wodą do uzyskania bezbarwnego odcieku, a absorbowaną substancję aktywną usuwa się przepuszczając przez kolumnę 50% wodny roztwór acetonu. Frakcje aktywne łączy się, zateża pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego w celu usunięcia acetonu i przepuszcza przez 5,9X104 cm kolumnę IRA-68 (cykl octanowy). Następnie płucze się kolumnę wodą do uzyskania czystego bezbarwnego odcieku, a substancję aktywną usuwa przez wypłukanie 0,1 m roztworem octanu sodowego. Po połączeniu frakcji aktywnych przepuszcza się je przez 4,3X72 cm kolumnę węgla (Pittsburgh Cal. 12X40), kolumnę przemywa sześciokrotnie większą od tej kolumny objętością wody, a substancję aktywną eluuje 30% wodnym roztworem acetonu. Po połączeniu frakcji aktywnych, stężeniu ich pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego w celu uniknięcia acetonu i liofilizowaniu, otrzymuje się 20–30 g produktu, którego analiza wykazuje zawartość 2,5% sodu.

Jednoamonową sól antybiotyku A 16884 poddano próbie na zwalczanie drobnoustrojów wywołujących choroby roślin. W tym celu wytwarza się wodny roztwór tej soli o stężeniu 400 części soli na milion części wagowych gotowego preparatu. Do doświadczenia stosuje się 30-dniowe rośliny pomidorów, po dwie na 1 naczynie. Rośliny w jednym naczyniu spryskuje się powyższym roztworem, suszy na powietrzu i zaszczepia pożywką podtrzymującą aktywny wzrost *Pseudomonas solanacearum*. Rośliny w drugim naczyniu spryskuje się natomiast identycznym roztworem, lecz nie zawierającym antybiotyku, traktując je jako grupę kontrolną, którą następnie zaszczepia się podobnie jak grupę badaną. Wszystkie rośliny przechowuje się w ciągu 24 godzin w wilgotnej komorze, a następnie usuwa z niej i na okres 7 dni umieszcza w dobrych warunkach uprawowych. Po upływie tego okresu poddaje się rośliny badaniu na obecność, a w przypadku obecności, na stopień infekcji. Stwierdzono, że rośliny spryskane jednoamonową solą antybiotyku A 16884 nie wykazują żadnych objawów choroby, wywoływanej przez *Pseudomonas solanacearum*, podczas gdy rośliny z grupy kontrolnej wykazują silne objawy takiej choroby.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowego antybiotyku A 16884 lub jego soli, znamienny tym, że hoduje się szczep *Streptomyces lipmanii* NRRL 3584 w pożywce, zawierającej przyswajalne źródła węgla, azotu i soli nieorganicznych, w warunkach aerobowych w zanurzeniu, do momentu wytworzenia odpowiedniej ilości żądanego antybiotyku.

2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że temperaturę pożywki utrzymuje się w granicach 25–37°C, a hodowlę ustroju prowadzi się w ciągu około 36–72 godzin.

3. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że antybiotyk A 16884 wyosabnia się z pożywki.

71107

WIDMO ABSORPCYJNE W PODCZERWIENI

ANTYBIOTYKU A 16884

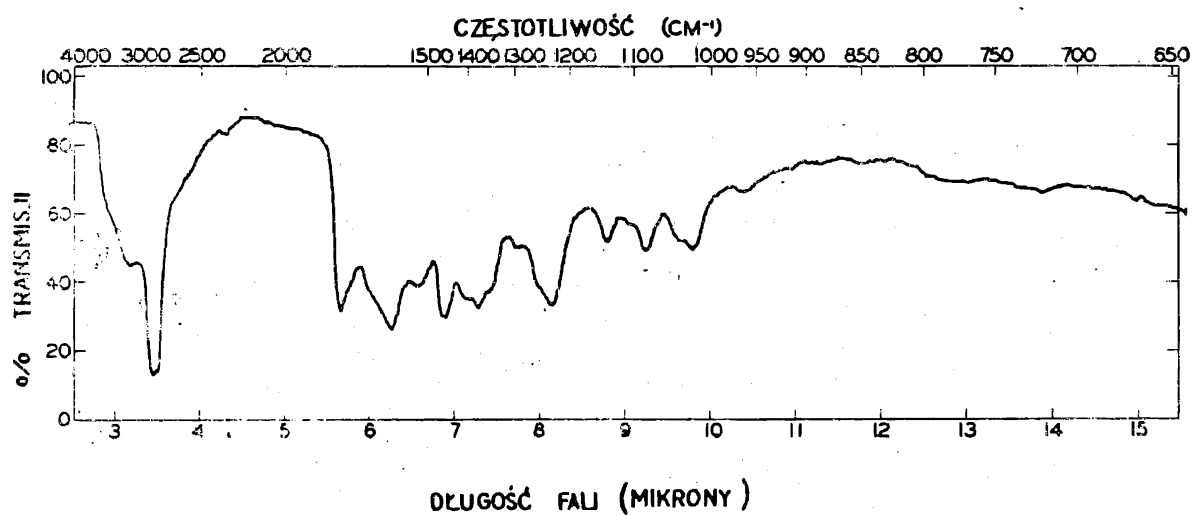


FIG. 1