



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 41785

Kl. 6 b, 16/03

Société des Usines Chimiques
Rhône — Poulenc
Paryż, Francja

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku

Patent trwa od dnia 12 lipca 1954 r.

Pierwszeństwo: 31 lipca 1953 r. (Francja)

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania nowego antybiotyku. Antybiotyk ten, który dalej nazwany jest spiramycyną, otrzymuje się na drodze fermentacji z kultury specjalnego, poniżej opisanego mikroorganizmu. Dotychczas nie można jej było otrzymać w postaci krystalicznej. Jako zasada stanowi ona biały, bezpostaciowy proszek; jej addycyjne sole z kwasami, np. siarczan i chlorowodorek, można wyosobnić w postaci stałej. Rozpuszcza się ona w chloroformie, w rozpuszczalnikach chlorowanych, alkoholach, heksanie, benzenie, ketonach, octanie etylowym i amylowym. Siarczan jest rozpuszczalny w wodzie i niższych alifatycznych alkoholach jak metanol, etanol, butanol. Analiza elementarna zasady wykazuje, że zawiera ona tylko takie pierwiastki jak węgiel, wodór, tlen i azot; liczne analizy, które zostały przeprowadzone na próbkach zasady dały następujące wartości:

węgiel	60,0 — 61,0%
wodór	8,9 — 9,4%
tlen	25,5 — 27,0%
azot	3,3 — 3,6%

Stosując metodę przeciwprądowego rozdzielania i urządzenie Graig'a (Journal of Biological Chemistry, 155 1944 str. 519), przy zastosowaniu cykloheksanu i wodnego roztworu spiramycyny, który zawierał 1% fosforanu dwusodowego można stwierdzić obecność trzech składników. Te trzy składniki wydają się bardzo podobne do siebie pod względem składu, właściwości chemicznych i działania bakteriobójczego.

Cieźar cząsteczkowy zasady obliczony z obójtęnego równoważnika albo przez określenie jonów siarczanowych w siarczanie wynosi $(400)_n$ do $(450)_n$.

Z oznaczenia ciężaru cząsteczkowego sposobem Rasta wynika, że $n = 2$. Zawartość azotu również mieści się w tych granicach, co wska-

zuje na to, że cały azot jest zasadowy. Zasada daje negatywne próby w następujących reakcjach: w reakcji Sakaguch'a, w reakcji Molish'a, w reakcji ninhydrynowej, w reakcji ninhydrynowej po kwaśnej hydrolizie, w reakcji z roztworem Fehlinga, w reakcji biuretovej, w reakcji soli żelazawej maltolu, w reakcji soli żelazawej maltolu po alkalicznej hydrolizie. Z mocnymi, stężonymi kwasami daje zasada zabarwienie czerwono-fioletowe. Zasada jest optycznie czynna, a jej roztwory w chloroformie albo w alkoholu etylowym są lewoskrętne

$$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -72^{\circ} \quad (C = 2\% \text{ w etanolu})$$

dla szczególnie czystego produktu.

Jej widmo absorpcyjne (roztwory w alkoholu etylowym) wykazuje w ultrafiolecie jedyne maksimum przy 231 mμ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 346$ dla szcze-

gólnie czystej próbki) przez co różni się ona od erytromycyny (280 mμ) i od karbomycyny (240 mμ), do których jest podobna w swoim działaniu bakteriobójczym. Różni się ona od tych dwóch antybiotyków tym, że bakterie uodpornione na działanie spiramycyny zachowują częściową wrażliwość na działanie erytromycyny i karbomycyny. Spiramycyna działa szczególnie na bakterie Gram — dodatnie, jest jednak mniej aktywna w stosunku do bakterii Gram — ujemnych; wykazuje ona pewne działanie na myco bakterie. Działa ona bardzo skutecznie na bakterie anaerobowe, a szczególnie na Clostridium septicum i Clostridium histolyticum. W poniższej tabeli przedstawiono obraz działania bakteriobójczego częściowo oczyszczonej próbki, przy czym działanie to oznaczono w środowisku ciekłym.

Tabela I

Szczepy bakteryjne	Ewentualna odporność	Wyleganie	Aktywność mcg/cm ³
staphy aureus 209 P	—	16 godz. w temp. 37°	1,4
" " Bs	Penicylina-Streptomycyna	" " "	3,5
" " 2700 R16	Streptotrycyna-Streptomycyna-neomycyna	" " "	1,6
" " Hb	Chlorotetracyklina-oksy-tetrazyklina	" " "	1,6
" " Beaujon 3	Chlorotetracyklina-oksy-tetra-cyklina-chloroamfenikol-penicylina-streptomycyna	16 godz. w temp. 37°	1,6
Klebs. pneumoniae ATCC 9997	—	" " "	33,0
Bac. cereus ATCC 6630	—	" " " 28°	2,7
Micro. citreus	—	16 " " 37°	5,1
Sarc. lutea ATCC 9341	—	40 " " 28°	0,8
Strept. faecalis	—	16 " " 37°	1,0
Strept. faecalis ATCC 9790	—	" " "	1,0
Strept. hemolyticus	—	" " "	0,6
Strept. viridans	—	" " "	3,1
Diplo. pneumoniae	—	" " "	0,2
Neisseria catarrhalis	—	40 " " 37°	10,3
Mycobact. Sp. ATCC 607	—	" " "	85,0
" " " NR	Neomycyna	" " "	38,0
" " " SR	Streptomycyna	" " "	38,0
Corynebact. pseudodiphthericum	—	" " "	3,5
Bac. subtilis ATCC 6633	—	16 " " 37°	3,75
Brucella bronchiseptica CN-387	—	" " "	75,0
Bac. mycoides	—	" " " 28°	2,3
Mycobact. phlei	—	40 " " 37°	33,0
Mycobact. parasmegmatis	—	" " "	166,0
Gaff. tetragena	—	16 " " 37°	0,8

Spirymycyna podawana in vivo myszy zarówno doustnie jak i podskórnie jest bardzo skuteczna w małych ilościach maksymalnie dopuszczalnych dawek przy infekcjach wywołanych streptokokami, pneumokokami staphylokokami.

Okazało się, że jest ona skuteczna jako środek przeciw malarii przy zakażeniu myszy P. Berghel. Wykazuje ona także działanie lecznicze i zapobiegawcze przy zakażeniach myszy tyfusem. Jej toksyczność dla myszy jest bardzo mała: mysz znosi ją dobrze w dawce doustnej 5 g/kg. Dawka śmiertelna (DL₅₀) dla 50% zwierząt wynosi przy stosowaniu podskórnym 1,5–2,5 g/kg, a przy stosowaniu dożylnym 0,15–0,25 g/kg.

Organizm, który wytwarza nowy według wynalazku antybiotyk jest pewnym rodzajem z gatunku *Streptomyces* i jest oznaczony poniżej jako „S. 3486” albo „*Streptomyces* 3486” (jak również jego odmiany).

Mikroorganizm ten wyosobniono z próbki ziemi, która pochodziła z pola z okolic Perronne w departamencie Somme (Francja). Sposób wyosobnienia jest następujący:

Próbkę ziemi zawieszono w sterylnej destylowanej wodzie, zawiesinę rozcieńczono, po czym małą część tej zawiesiny rozpostarto na płytce Petri'ego z agarem jako pożywką. Po 7-miodniowym okresie wyłęgania w 28°C pobrano kolonię *Streptomyces* 3486 za pomocą drucika platynowego do zaszczepienia agaru, jako pożywki, umieszczonego w skośnie ustawionych próbkach w celu otrzymania większych ilości mikroorganizmu.

Ten szczep *Streptomyces* 3486 złożono w laboratorium w Northern Regional Research Laboratory (NRRL), Peoria 5 Illinois, USA pod nazwą NRRL 2420.

Przy zastosowaniu klasyfikacji Bergeys'a „Manual of determinative Bacteriology” (VI wydanie 1949) dla gatunku *Streptomyces* można ten organizm uważać za pokrewny *Streptomyces griseolus*, który najpierw został opisany przez Waksmana pod nazwą *Actinomyces* 96 (Soil Science 8, 121 (1919)). Jak się poniżej okaże między *Streptomyces* 3486 a mikroorganizmem opisanym przez Waksmana istnieją pewne różnice, tak że te dwa mikroorganizmy nie można zaszeregować do tego samego rodzaju.

Niektóre właściwości *Streptomyces* 3486, szczególnie wytwarzanie brązowego pigmentu w środowisku syntetycznym i na ziemniakach mogłyby pozwolić na zaszeregowanie go w pobliżu *Streptomyces fimicarius*. Wytwarzanie pigmen-

tu przez *Streptomyces* 3486 jest w tych dwóch przypadkach bardzo niewielkie. Różni się on poza tym od *Streptomyces fimicarius* szeregiem innych właściwości.

W końcu szczep *Streptomyces* 3486 wykazał w czasie prac nad jego identyfikacją ~~zmienne~~ właściwości. Poniższy opis podaje jego najczęściej występujące właściwości.

Morfologia mikroskopowa.

Szczep *Streptomyces* 3486 podczas hodowania na agarze Czapka z glukozą wytwarza rozgałęzione nitki. W warunkach sprzyjających hodowli można szybko zaobserwować tworzenie się łańcuchów zarodników, które są przyczepione do nitki głównych pojedynczo lub zbiorowo w drzewiastych rozgałęzieniach. Nitki zarodników mogą być zakrzywione, śrubowe albo nieregularnie skręcone.

W kątach między nitkami zarodników znajdują się często elementy niesegmentowe w postaci śrub z licznymi zamkniętymi spiralami. Zarodniki mają naogół różny kształt, od krótkiego owalnego do okrągłego.

Postać kolonii.

Pojedyncze hodowle zarodnikowe na agarze z asparaginą dają kolonie okrągłe, których wielkość może się zmieniać w zależności od stopnia rozwoju. W przypadku gęstej hodowli kolonie są małe, okrągłe, półkuliste i mogą w pewnych przypadkach wykazywać mniej lub więcej wyraźne centralne wgłębienia. Tworzenie się zarodników jest szybkie i na ogół rozciąga się na całą kolonię albo na jej obwód z tendencją tworzenia wokół kolonii drzewiastych rozgałęzień. Zabarwienie początkowo białej napowietrznej grzybni w momencie wytwarzania zarodników przechodzi w szare.

W przypadku kiedy kolonie nie są zbyt liczne, kształt ich może się zmieniać, jednak najczęściej wygląd takiej kolonii jest okrągły i kolonia może osiągnąć średnicę do 10 mm.

Zółtawa wegetatywna grzybnia ma postrzępione brzegi i posiada wzdłuż promieni głębokie fałdy i liczne współśrodkowe wybrzuszenia, przy czym na ogół w środku kolonii powstaje wgłębienie. Wzdłuż fałd występują rysy, szczególnie w środku kolonii, dzięki którym widać wegetatywną grzybnię od strony dolnej. Początkowo biała grzybnia napowietrzna (bardzo lekko zabarwiona na kolor jasno-żółto-różowy) w momencie tworzenia zarodników bardzo szybko staje się szara. To tworzenie się zarodników może nastąpić bardzo intensywnie na zewnętrznej części kolonii.

Warunki hodowlane — właściwości biochemiczne.

Warunki hodowli i reakcje biochemiczne przedstawiono w poniższej tabeli. Zastosowane środowiska hodowlane zostały przygotowa-

ne przeważnie według ujawnionych danych przez S. A. Waksmana w „The Actinomycetes” (1950, Chronica Botanica Company, Waldham Mas; USA; strona 193—197).

Dane określone dla różnych środowisk podane w „The Actinomycetes” zostały zachowane.

Tabela II

Cechy charakterystyczne hodowli

Środowisko	Grzybnia wegetatywna	Grzybnia napowietrzna	tworzenie się zarodników	exo pigment (zabarwienie)
Agar syntetyczny (środowisko Czapka Nr 1)	Żółtawa do szarawej rozwija się prawie wyłącznie pod powierzchnią, wzrost na powierzchni ogranicza się prawie całkowicie do grzybni napowietrznej	biała, w momencie tworzenia się zarodników przechodzi w szarą	szybkie	b. słabe brązowo-żółtawe
Agar syntetyczny z glukozą	Żółtawa do pomarańczowej	biało-żółtawa	wolniejsze szarawe	bardzo słabe, brązowo-czerwone
Agar z asparaginą Nr 3	Żółtawa — postrzępiona	biała	szare z lekką tendencją do koloru żółto-zielonego, może tworzyć na brzegach kolonii drzewiaste rozgałęzienia	słabe, brązowo-żółte
Agar z jabłczanem wapniowym	Szybki rozwój, podobnie jak na pożywce syntetycznej Nr 1			brak zabarwienia
Agar z tyrozyną (Nr 4)	Prawie nie rozwija się	—	—	brak zabarwienia
Glukoza-bulion (Nr 16)	Wzrost umiarkowany żółtawa	bardzo słabo rozwinięta	—	bursztynowo-żółta, słabe albo brak zabarwienia
Pepton-agar-bulion (Nr 5)	bursztynowo-żółta	na brzegach kultury białe	—	żółto-brązowe, słabe albo bez zabarwienia
Pepton-glukoza-agar	żółtawa	słabo rozwinięta, biaława	istnieje lub nie istnieje w zależności od kultury żółtawo-szare o ile istnieje	słabe brązowo-żółtawe albo bez zabarwienia

Środowisko	Grzybnia wegetatywna	Grzybnia napowietrzna	tworzenie się zarodników	exo pigment (zabarwienie)
Środowisko Emersona	żółto-pomarańczowa do żółto-brązowej	biała, na brzegach kultury bardzo rozwinęta	istnieje lub nie istnieje w zależności od kultury żółta-wo-szare o ile istnieje	słabe brązowo-żółtawe albo bez zabarwienia
Ziemniaki	jasna do ciemno-brązowej w zależności od kultury	powierzchnia o wyglądzie proszku z odzieniem szarym	istnieje lub nie istnieje w zależności od kultury, szarawe	różne, słabo brązowe do brązowo-czerwonego, może zabarwić ziemniaki i wodę na dnie rurki

Właściwości biochemiczne.

Mleko w temperaturze 26°C: hodowla tworzy błonkę. Częściowa peptonizacja w ciągu 1 miesiąca bez widocznej koagulacji. Strefa speptonizowana może przybierać zabarwienie brunatno-pomarańczowe albo czerwone. Na mleku z czerwienią bromokrezolową: pH niezmienione albo w zależności od kultury przechodzi w zakres alkaliczny.

Mleko w temperaturze 37°C: rozwój słabszy. Zdarza się występowanie kłaczków, częściowa peptonizacja.

Zelatina (skład nr 7 i 8 według Waksmana): średnie upłynnienie. Żółtawa błonka i żółtawe kłaczkki w części upłynnionej.

Zabarwienie: zmienne, brunatno-pomarańczowe, słabe w części upłynnionej, silniejsze w środowisku glukozy.

Azotyny: redukcja azotanów do azotynów następuje w środowisku syntetycznym (w obec-

ności sacharozy). W środowisku organicznym reakcje na azotyny są ujemne.

Zastosowanie różnych źródeł węgla: doświadczenia te zostały przeprowadzone przy zastosowaniu metody Pridham'a i Gottliba (J. Bact. 56, 107—114 (1948).

Substancje, które można korzystnie stosować: gliceryna, arabinoza, glukoza, lewuloza, mannoza, laktoza, ramnoza, galaktoza, skrobia, mannit.

Rzadziej stosowane substancje (hodowle dobrze lecz wolniej rozwijające się) albo nieregularnie stosowane substancje: ksyloza, sacharoza, maltoza, inozyt.

Substancje nie nadające się do stosowania: rafinoza, erytryt, dulcyt, sorbit.

Porównanie między *S. griseolus* i *S. 3486*: poniższa tabela podaje pewne właściwości, z której widoczne są wspólne lub różne cechy opisanego przez Waksmana szczepu *S. griseolus* i szczepu wytwarzającego spiramycynę.

Tabela III

	<i>Streptomyces griseolus</i>	Szczep <i>S. 3486</i>
Morfologia mikroskopowa	Nie zauważono postaci spiralnych, zarodniki owalne do kulistych	obecne formy spiralne; zarodniki owalne lub kuliste
Agar syntetyczny	przewaga szarej grzybni napowietrznej, pigment nierozpuszczalny	przewaga szarej grzybni napowietrznej, bardzo słaby żółto-brązowy pigment
Glukoza-bulion Zelatina	pigment brązowy, słaby lub brak upłynnia, żółtawa błonka	pigment bursztynowo-żółty lub brak upłynnia; słabo żółto-brązowy pigment
Ziemniaki	kremowy do czarnego, ziemniak brązowieje	jasno do ciemno brązowego, ziemniak zabarwia się na brązowo
Mleko	koaguluje, peptonizuje	przy 28°C: peptonizuje bez widocznej koagulacji
Azotany	redukuje do azotynów	redukuje do azotynów
Pigment	tworzenie słabego brąz. pigmentu	tworzenie słabego żółtawego do brązowego pigmentu

Według jednego ze sposobów według wynalazku spiramycynę wytwarza się w ten sposób, że wodny ośrodek z pożywką zaszczepia się kulturą szczepu S. 3486, następnie przeprowadza się fermentację aerobową i wytworzona w ten sposób spiramycyna oddziela od środowiska hodowlanego. Środowisko hodowlane zawiera także opisany już w literaturze antybiotyki (Cosar, Ninet, Pinnert, Preud'homme, C. R. 234, 1498 (1952), który nazwano kongocydyną (Despois i Ninet, 6. Internationaler Mikrobiologischer Kongres, *Rassunti delle Comunicazioni*, tom I, str. 162 (1953).

Kongocydyna nie posiada tych samych ciekawych właściwości co spiramycyna i może być wyodrębniona w postaci krystalicznej. Rozdzielenie tych dwóch antybiotyków można łatwo przeprowadzić jak to opisano poniżej.

Hodowlę S. 3486 można prowadzić na drodze fermentacji powierzchniowej; przeważnie jednak lepiej jest prowadzić proces fermentacji na drodze podpowierzchniowej.

Fermentację można prowadzić, w szczególności według następującego schematu:

Hodowla na agarze

↓
Hodowla w erlenmeyerkach wstrząsanych

↓
Posiew w zbiorniku fermentacyjnym

↓
Hodowla produkcyjna w zbiornikach fermentacyjnych.

Środowisko z pożywką zawiera jak w innych środowiskach w których hoduje się inne grzybyki w celu otrzymania antybiotyków, źródło węgla przyswajalnego, organiczne lub nieorganiczne źródło azotu przyswajalnego, pewne sole mineralne jak fosforany i ślady różnych metali, które normalnie znajdują się jako zanieczyszczenia w pozostałych składnikach środowiska.

Jako źródło węgla przyswajalnego można stosować tłuszcze (oleje roślinne lub zwierzęce), różne poliole (glicerynę) i korzystnie przyswajalne węglowodany jak zwykłą skrobię, skrobię rozpuszczalną, cukier jak sacharozę, glukozę, maltozę i dekstrozę i inne węglowodany rozpuszczalne lub tylko częściowo rozpuszczalne w wodzie jak alkohole-cukry.

Jako odpowiednie źródło azotu przyswajalnego można stosować liczne substancje jak aminokwasy, shydrolizowaną lub nieshydrolizowaną kazeinę, mączkę rybną, mąkę sojową, ekstrakty mięsne, pozostałość z ekstrakcji wątroby, rozpuszczalne składniki wywaru gorzelnianego tak zwane *distillers solubles*, ekstrakty albo autolizaty drożdżowe i różne inne substancje pocho-

dzienia roślinnego lub zwierzęcego, zawierające azot. Jako źródło azotu można dodać do środowiska także substancje chemiczne, jak mocznik, azotany albo sole amonowe.

Stwierdzono, że namok kukurydźniany z powodu zawartych w nim dużych ilości substancji organicznych i nieorganicznych jest dobrym środkiem pomocniczym dla środowiska fermentacyjnego. Korzystne jest także dodawanie do środowiska zasadniczych soli mineralnych, jak soli sodowych, np. chlorku, soli wapniowych, np. węglańu itd.

PH środowiska doprowadza się przed sterylizacją do odczynu obojętnego, korzystnie do wartości między 6—7. Fermentację prowadzi się w temperaturze 24—28°C, korzystnie w 26°C. Rozwój hodowli produkcyjnej nie jest bardzo szybki; można jednak uważać go za ukończony po trzech lub czterech dniach. Głównymi charakterystycznymi cechami procesu fermentacji jest początkowe obniżenie wartości pH do około 6,4, a później po około 30 godzinach wzrost wartości pH do około 7,5, a czasem i wyżej. Wydaje się, że ten wzrost wartości pH zbiega się z zakończeniem zużycia glukozy.

Aktywność antybiotyczna, którą wywołuje spiramycyna wzrasta regularnie od początku fermentacji. Jakkolwiek napowietrzanie nie jest czynnikiem krytycznym i może zmieniać się w szerokich granicach korzystne jest doprowadzanie powietrza w ilości 0,5—2 litrów na litr bulionu na minutę.

Spiramycynę można wyosobnić z cieczy fermentacyjnej rozmaitymi sposobami. Sposób, który dotychczas okazał się korzystny, polega na ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika. Można stosować rozpuszczalnik, który pozostawia w środowisku fermentacyjnym substancje, tworzące się równocześnie podczas fermentacji jak np. kongocydynę. Można także stosować rozpuszczalnik, który wyekstrahuje część tych zanieczyszczeń, które można usunąć w czasie dalszej przeróbki. Ekstrakcja ta następuje po przesączeniu płynu fermentacyjnego w obecności pomocniczych środków filtrujących przy pH = 7—9. Przy pH = 8—11, korzystnie przy pH = 9 prowadzi się ekstrakcję rozpuszczalnikiem nie mieszającym się z wodą, który należy do grupy alkoholi szczególnie butanolu, alifatycznych ketonów np. ketonu metyloetylowego, ketonu metyloizobutyłowego, alifatycznych chlorowców węglowodorów np. (chloroformu), aromatycznych węglowodorów np. benzenu i estrów np. octanu etylowego albo amylowego. Otrzymany w ten sposób roztwór ekstrahuje się następnie wodą

o odczynie kwaśnym (przy pH poniżej 4 korzystnie przy pH = 2—3), wodny ekstrakt zagęszcza się i ekstrahuje przy pH = 9 za pomocą chloroformu albo benzenu. Otrzymany ekstrakt następnie zagęszcza się, odwadnia doprowadza za pomocą kwasu siarkowego do pH = 5 i wytrąca eterem siarczan antybiotyku.

Pierwszy organiczny ekstrakt można również zagęścić, ekstrahować wodą przy pH = 2 i ten wodny roztwór traktować jak podano wyżej. Otrzymany w ten sposób surowy siarczan można następnie oczyścić przez następującą po tym ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi lub wodą albo chromatograficznie.

Poniższe przykłady wyjaśniają bliżej istotę wynalazku, nie ograniczając go przy tym. Do wolnie wybraną jednostką jest najmniejsza ilość określonego oczyszczonego produktu, która rozpuszczona w 1 cm³ odpowiedniego środowiska hodowlanego nie dopuszcza do rozwoju *Staphylococcus aureus* (szczep F. D. A. 209 P). Dla tego produktu wynosi ta ilość 1 mikrogram.

Przykład I. Przygotowuje się następujące środowisko:

namok kukurydziany (50% suchej substancji)	4,0%	wagowo
glukoza	2,0%	„
węglan wapniowy	0,5%	„
chlorek sodowy	0,5%	„
siarczan magnezowy	0,1%	„

40 litrów tego środowiska wprowadza się do zbiornika fermentacyjnego o objętości 75 litrów. Wartość pH doprowadza się do 7 i sterylizuje mieszaninę przez 45 minut w 120°C. Po ochłodzeniu do 26°C zaszczepia się podłoże 250 cm³ kultury S. 3486, znajdującej się we wstrząsanej erlenmeyerce. Kulturowo napowietrza się i miesza w zbiorniku fermentacyjnym przez 25 godzin i używa jej do zaszczepienia kultury produkcyjnej.

Kulturowo produkcyjną doprowadza się do zbiornika fermentacyjnego o objętości 350 litrów, który jest załadowany 200 litrami mieszaniny o następującym składzie:

glukoza	2,0%	wagowo
mączka sojowa	4,0%	„
distillers solubles	0,5%	„
chlorek sodowy	2,0%	„
węglan wapniowy	1,0%	„

pH przed sterylizacją wynosi 6,8.

Rozwój hodowli produkcyjnej nie jest zbyt szybki, można go jednak uważać za zakończony po 3—4 dniach w temperaturze 26°C przy napowietrzaniu 12 m³ powietrza na godzinę i przy

mieszaniu z szybkością 400 obrotów na minutę. Na początku następuje spadek pH do 6,4, a następnie po upływie około 30 godzin pH wzrasta do około 7,5. Po 4 dniach otrzymany produkt wykazuje aktywność 92 jednostek/cm³.

Przykład II. Do zbiornika fermentacyjnego o objętości 350 litrów wprowadza się 200 litrów mieszaniny o następującym składzie:

glukoza	1,0%	wagowo
namok kukurydziany (50% suchej substancji)	3,0%	„
fosforan jednopotasowy	0,1%	„
siarczan magnezowy	0,1%	„
chlorek sodowy	2,0%	„
węglan wapniowy	0,5%	„

pH doprowadza się do wartości 7 za pomocą ługu sodowego i sterylizuje środowisko przez 45 minut w temperaturze 120°C. Środowisko oziębia się do 26°C i zaszczepia jak w przykładzie I. Fermentację prowadzi się przy mieszaniu i napowietrzaniu. Maksymalną aktywność uzyskuje się po 60 godzinach, przy czym wynosi ona 129 jednostek/cm³.

Przykład III. Fermentację przeprowadza się jak w przykładzie II lecz zamiast glukozy stosuje się 2% sacharozy a namok kukurydziany w ilości 2% wagowych. W warunkach tych maksymalna aktywność wynosi po 40 godzinach 90 jednostek/cm³.

Przykład IV. Do zbiornika fermentacyjnego o objętości 30 litrów wprowadza się 15 litrów mieszaniny o następującym składzie:

glukoza	3	% wagowo
autolizat drożdżowy	1,0%	„
chlorek sodowy	2,0%	„
siarczan magnezowy	0,1%	„
fosforan jednopotasowy	0,1%	„
węglan wapniowy	0,5%	„

pH środowiska doprowadza się do 7 za pomocą ługu sodowego, a po sterylizacji i oziębieniu do 26°C zaszczepia się środowisko za pomocą 1 litra szczepionki kultury, która została wyhodowana w zbiorniku fermentacyjnym w uprzednio opisanym środowisku z namokiem kukurydzianym. Po czterodniowej hodowli otrzymuje się 140 jednostek/cm³.

Przykład V. 210 litrów cieczy fermentacyjnej o pH = 8 zadaje się 10 kg środka pomocniczego do sączenia (Supercel Hyflo) i sączy na prasie filtracyjnej.

Placek filtracyjny przemycza się 50 litrami wody, przesącz, który wynosi 230 litrów i zawiera 15,8 milionów jednostek alkalinizuje się do pH = 9 za pomocą ługu sodowego i ekstrahuje 46 litrami ketonu metyloizobutyloвого. Roz-

puszczalnik oddziela się, a fazę wodną ekstrahuje powtórnie 23 litrami ketonu metyloizobutyloвого. Po zdekantowaniu obydwie ekstrakty miesza się i przemywa 6 litrami wody, o $\text{pH} = 9$. Antybiotyk zawarty w rozpuszczalniku ekstrahuje się wodą w temperaturze 5°C , przy czym wartość pH obniża się do 3 przez dodanie 5%-owego roztworu kwasu fosforowego. Ekstrakcję tę prowadzi się z 8 litrami wody, a następnie trzykrotnie z 4 litrami wody; cała zawartość antybiotyku przechodzi do fazy wodnej. Wodny roztwór, który doprowadzono do $\text{pH} = 6,5$ za pomocą rozcieńczonego ługu sodowego podgęszcza się w próżni, w temperaturze nie przekraczającej 35°C . Otrzymuje się 1750 cm^3 roztworu, który zawiera 14,6 milionów jednostek. Antybiotyk ekstrahuje się z wodnego, alkalicznego o $\text{pH} = 9$ roztworu najpierw 1 litrem, następnie dwa razy po 0,5 litra benzenu. Ekstrakt benzenowy podgęszcza się w próżni, w temperaturze nie przekraczającej 30°C , do objętości 100 cm^3 . Następnie dodaje się 100 cm^3 alkoholu n-butyloвого i ustala pH do wartości 5 przez dodanie roztworu 2 n kwasu siarkowego w butanolu. Roztwór podgęszcza się znowu do 100 cm^3 i wytrąca siarczan antybiotyku za pomocą 2 litrów eteru.

Siarczan, który wypada w postaci białego proszku odsąca się, przemywa eterem i suszy. Otrzymuje się 9,6 g siarczanu o zawartości 1320 jednostek/mg co odpowiada 80% wydajności.

Przykład VI. 185 litrów cieczy fermentacyjnej sący się jak w przykładzie V. Przesąc w ilości 155 litrów zawierający 12,4 milionów jednostek doprowadza się do $\text{pH} = 9$ za pomocą 10%-owego roztworu ługu sodowego i ekstrahuje kolejno 40 litrami, a później 20 litrami n-butanolu. Połączone ekstrakty butanole podgęszcza się w próżni do 10 litrów, przy czym temperatura nie przekracza 30°C .

Roztwór butanoleowy ekstrahuje się kolejno 8 litrami wody, a później dwukrotnie wodą w ilości po 3 litry, przy czym pH obniża się kwasem siarkowym do wartości 2. Roztwór wodny, którego pH doprowadzono do 6,5 za pomocą roz-

cieńczonego ługu sodowego, podgęszcza się w próżni do 1500 cm^3 w temperaturze nie przekraczającej 30°C . Roztwór wodny zawiera 8 milionów jednostek.

Roztwór wodny zakalkalizowany do $\text{pH} = 9$ ekstrahuje się trzykrotnie chloroformem w ilości po 700 cm^3 . Ekstrakty chloroformowe podgęszcza się w próżni i traktuje jak w przykładzie I.

Otrzymuje się 7,4 g antybiotyku w postaci siarczanu o zawartości 746 jednostek/mg co odpowiada 44% wydajności.

Przykład VII. 30 g surowego siarczanu antybiotyku rozpuszcza się w 700 cm^3 wody. Wartość pH ustala się na 9 za pomocą ługu sodowego i przeprowadza trzykrotnie ekstrakcję za pomocą benzenu w ilości po 300 cm^3 . Połączone ekstrakty benzenowe przemywa się 200 cm^3 wody o $\text{pH} = 9$ i odparowuje roztwór do sucha w niskiej temperaturze.

Otrzymuje się 24,2 g zasady spiramycyny o zawartości 2150 jednostek/mg.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku, znamienny tym, że do jego wytwarzania stosuje się szczepy grzybowe z grupy streptomycetów, zwłaszcza streptomyces 3486, przy czym proces wytwarzania prowadzi się na drodze aerobowej hodowli szczepu streptomyces 3486, najkorzystniej sposobem powierzchniowym w środowisku zawierającym przyswajalny węgiel, azot i sole mineralne do czasu wytworzenia przez ten mikroorganizm spiramycyny, którą ekstrahuje się z cieczy fermentacyjnej przy wartości $\text{pH} = 8-11$ za pomocą rozpuszczalnika nie mieszającego się z wodą i ewentualnie traktuje się spiramycynę kwasem w celu wytworzenia jej soli odpowiadającej temu kwasowi.

Société des Usines Chimiques
Rhône-Poulenc

Zastępca: Kolegium Rzeczników Patentowych

