

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

79962

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 25.02.1969 (P. 131952)

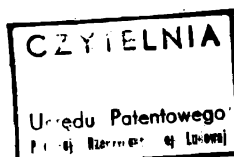
Pierwszeństwo: 06.12.1968 Stany
Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 26.02.1973

Opis patentowy opublikowano: 20.12.1975

Kl. 30h,6

MKP C12d, 9/14



Twórcy wynalazku: Robert L. Hamill, Marvin Nartin Hoehn

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

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku A204

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowego antybiotyku A204 lub jego soli o właściwościach szkodnikobójczych.

Sposobem według wynalazku nowy antybiotyk A204 wytwarza się przez hodowanie nowego szczepu *Streptomyces albus* w warunkach aerobowych w środowisku, zawierającym źródło przyswajalnego węgla, azotu i nieorganicznych soli.

Antybiotyk A204 wykrysztalizowany z eteru etylowego stanowi krystaliczną substancję o barwie białej i o temperaturze topnienia 96–98°C rozpuszczalną w estrach, benzenie, chlorowcowanych węglowodorach, dwumetyloformamidzie, dwumetylosulfotlenku, eterze i ketonach, słabo rozpuszczalną w alkoholach i bardzo słabo w wodzie. Związek ten jest substancją kwaśną o jednej dającej się zmiareczkować grupie o pK 6,1. Pozorny ciężar cząsteczkowy tego związku, oznaczony metodą zmiareczkowania, wynosi około 900. W skład tego związku wchodzi 61,74% węgla, 9,37% wodoru i 28,38% tlenu. Optyczna skręcalność właściwa związku (α)_{25°} D oznaczona w roztworze metanolo-

wym o stężeniu 1% wagowo/objętościowym wynosi +68,12°. Analiza podczerwonego widma absorpcyjnego w zakresie 2,0–15,0 mikronów, dokonana na roztworze związku w chloroformie, wykazuje pasma przy długości fali 2,95; 3,43; 5,95; 6,87; 7,26; 7,80; 8,52; 8,95; 9,17; 9,34; 9,59; 9,82; 10,07; 10,24; 10,51; 10,77; 11,40; 11,80 mikronów. Charakterystycz-

2

nego nadfioletowego widma absorpcyjnego nie stwierdzono.

Optyczną skręcalność właściwą wyznaczono dla związku w postaci krystalicznego wolnego kwasu, suszonego w ciągu około 15 godzin w temperaturze pokojowej pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego, nad bezwodnym chlorkiem wapniowym. Miareczkowanie przeprowadzono metodą elektrometryczną w 66% roztworze tego kwasu w mieszaninie metyloformamidu z wodą, a analizę elementarną przeprowadzono dla związków wysuszonego nad pięciotlenkiem fosforu w temperaturze około 80°C pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego.

Nowy szczep *Streptomyces albus* stosowany w procesie prowadzonym sposobem według wynalazku wyosobniono z próbek gleby w miejscowości Perry w stanie Floryda w Stanach Zjednoczonych Ameryki. Próbkę tej gleby mieszano w wyjałowionej wodzie destylowanej i otrzymane zawiesiny nanoszono na płytki pożywki agarowej, które następnie poddawano hodowli w ciągu kilku dni w temperaturze około 30°C. Po zakończeniu inkubacji, przeniesiono otrzymane kolonie na skosy agarowe za pomocą pętli platynowej, po czym zaszczipione skosy agarowe poddano inkubacji, otrzymując większe ilości organizmów wytwarzających antybiotyk A204.

Otrzymany mikroorganizm, zdolny do wytwarzania związku A204, zdeponowano w zbiorze Northern Utilization Research and Development Division,

Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture (poprzednio Northern Regional Research Laboratories) w Peorii w stanie Illinois, gdzie jest oznaczony numerem NRRL 3384.

Ze względu na brak jednolitych i pewnych ustaleń taksonomicznych co do grupy *Streptomyces*, występują zawsze wątpliwości związane z klasyfikacją nowo odkrytych ustrojów. Mikroorganizm, z którego otrzymuje się antybiotyk A204, wydaje się upodabniać swymi najważniejszymi cechami do publikowanych opisów ustrojów *Streptomyces albus*, *Streptomyces albidoflavus* i *Streptomyces flavolus*. Uważa się jednak nowy ustrój za szczep *Streptomyces albus* (Rossia Doria) Waksman i Henrici, w oparciu o opis szczepu *S. albus* ATCC 3004 przez Lyonsa i Pridhama w J. Bacteriol nr 83 (1962) str. 370—380, oraz szczepu *S. albus* IMRU 3905 przez Waksmana w The Actinomycetes, t. II pt. „Klasyfikacja, identyfikacja i opis rodzajów i gatunków”, Williams and Wilkins Co., Baltimore (1961).

Pomimo podobieństw, istnieją jednak dostateczne różnice pozwalające odróżnić nowy mikroorganizm od wszystkich znanych dotychczas szczepów *Streptomyces albus*. Szczep NRRL 3384 został zatem sklasyfikowany jako nowy szczep *Streptomyces albus*.

W taksonomicznych badaniach szczepu *Streptomyces albus* wytwarzającego antybiotyk A204 zastosowano metody zalecone dla International Streptomyces Project, opisanego przez Shirlinga i Gottlieba w International Bulletin Systematic Bacteriol nr 16 (1966), str. 313—340 i w innych dokumentach. Badania zużycia węgla prowadzono metodą opisaną przez Pridhama i Gottlieba w J. Bac. nr 56 (1948), str. 107. Uzyskane w wyniku badań taksonomicznych wyniki podano w tablicy I. Jako nazwy barw zastosowano terminy według Kelly'ego i Judda „The ISCC-NBS Method of Designating Colours and a Dictionary of Colour Names” U.S. Dept. of Commerce Circ. 553, Washington D.C. Dane w nawiasach odnoszą się do szeregu kolorów Tresnera i Baccusa — „System of Colour Wheels for Streptomyces Taxonomy” w Applied Microbiology nr 11 (1966) str. 335—338. W nawiasach kwadratowych podaje się bloki barw według Maerza i Paula Dictionary of Colour, McGraw-Hill, New York (1950).

Tablica I

Opis szczepu NRRL 3384

Morfologia	Spiralne sporofory o 3—50, zwykle 10—50 sporach w łańcuchu, spory o kształtach od owoidalnego do wydłużonego o wielkości 1,9 u × 1,3 u: powierzchnia widoczna na fotomikrografii elektronicznej — gładka.
------------	---

Hodowla na pożywkach: Jablczan wapniowy	Rozrost obfity o barwie odwróconej bładożółtej zieleni 10B1; sporowanie i grzybnia powietrzna — obfite, (7) błada żółcień, 2ba 11C1 brak rozpuszczalnego pigmentu, środowisko odżywcze lekko sklarowane.
Owsianka z pastą pomidorową	Rozrost obfity o barwie odwróconej szarawej żółci 11B2, sporowanie i grzybnia powietrzna — obfite (W) biel a; brak rozpuszczalnego pigmentu.
ICP nr 2 (Agar drożdżowo słodowy)	Rozrost obfity o barwie odwróconej szarawej żółci 11B2, sporowanie i grzybnia powietrzna — obfite (Y) błada żółcień, 2ba 11C1, brak rozpuszczalnego pigmentu.
ICP nr 3 (Agar owsiany)	Rozrost spory o barwie odwróconej bieli; sporowanie i grzybnia powietrzna — spore (W) biel a, brak rozpuszczalnego pigmentu.
ICP nr 4 (Agar z soli nieorganicznych i skrobi)	Rozrost obfity o barwie odwróconej szarawej żółci 11B2, obfite sporowanie i grzybnia powietrzna (Y) błada żółcień 2ba 11C1, brak rozpuszczalnego pigmentu.
ICP nr 5 (Agar glicerynowo-asparaginowy)	Rozrost obfity o barwie odwróconej bładożółtej zieleni 10B1, obfite sporowanie i grzybnia powietrzna (W) biel a; brak rozpuszczalnego pigmentu.
Agar Czapka	Duży rozrost o barwie odwróconej bieli, duże sporowanie i grzybnia powietrzna (W) biel a; brak rozpuszczalnego pigmentu.
Agar tyrozynowy	Bardzo słaby rozrost, nie ustalone barwy.
Agar glikozowo-asparaginowy	Spory rozrost o barwie odwróconej żółci 11C1, średnie sporowanie i grzybnia powietrzna (Y) błada żółcień 2ba 11C1, brak rozpuszczalnego barwnika.
Agar Emersona	Rozrost obfity o barwie odwróconej szarawej żółci 12B3, obfite sporowanie i grzybnia powietrzna (GY) żółtawa szarzeń, 2dc 10A2, brak rozpuszczalnego pigmentu.
Agar Bennetta	Bardzo słaby rozrost, nie ustalone barwy.

Agar odżywczy	Średni rozrost o barwie odwróconej szarawej żółcieni 11B2, średnie sporowanie i grzybnia powietrzna (W) biel a, brak rozpuszczalnego pigmentu.
Działanie na mleko	Bez zmian po upływie 14 dni.
Redukcja azotanu	Dodatnia
Wytwarzanie melaminy	Dodatnie
Agar peptonowo-żelazowy	Ujemne
Ekstrakt tryptonowo-drożdżowy	Ujemne
Upłynnianie żelatyny	Nie występuje w ciągu 14 dni.
Wymagana temperatura	Rozrost i sporowanie — średnie w temperaturze 26°C, dobre w temperaturze 30°C. Rozwój wegetacyjny w temperaturze 37°C, ślady rozwoju wegetacyjnego w temperaturze 43—49°C. W temperaturze 55°C — brak rozrostu.
Wpływ zmiany wartości pH na grzybnie	Brak wpływu na wszystkie środowiska z wyjątkiem ICP nr 4, które pod wpływem 0,05 n HCl lub 0,05 n NaOH zmienia barwę z brunatnej na białą lub staje się bezbarwne.
Wpływ zmiany wartości pH na rozpuszczalny pigment	Brak rozpuszczalnego pigmentu.
Zużycie węgla:	
L — arabinoza	+
Sacharoza	(—)
D — ksyloza	(+)
D — fruktoza	(+)
Gluchoza	+
Ramnoza	+
Rafinoza	+
I — inozyt	+
D — mannit	+
próba kontrolna	—

Oznaczenia stosowane w tablicy I:

- + = dodatnie
 (+) = prawdopodobne
 (—) = wątpliwe
 — = brak zużycia węgla

Dzięki temu, że, jak wskazują powyższe dane, szczep może wykorzystywać różne źródła energii, jako środowisko do hodowli tego szczepu w celu wytworzenia antybiotyku A204 stosuje się różne pożywki przy czym ze względu na kryteria ekonomiczne, wydajność antybiotyku oraz łatwość jego wyosabniania, pewne pożywki mają korzystniejsze zastosowanie od innych. Takimi korzystnymi środowiskami, źródłami przyswajalnego węgla, są na przykład glikoza, fruktoza, skrobia, gliceryna, me-

lasa, dekstryna, cukier nieoczyszczony i tym podobne, przy czym najkorzystniejszą pożywką-źródłem węgla — jest glikoza. Innymi odpowiednimi pożywkami są źródła przyswajalnego azotu, takie jak mączka sojowa, substancje stałe z wyciągu namokowego kukurydzy, drożdże, mączka z nasion bawełny, ekstrakt wołowy, peptony (mięsne lub sojowe), kazeina, mieszaniny aminokwasów itp. Korzystnie jako źródła azotu stosuje się peptony, mączkę sojową, mieszaniny aminokwasów i tym podobne. Do środowiska pożywkowego można również wprowadzać sole nieorganiczne, wytwarzające jony sodowe, potasowe, amonowe, wapniowe, fosforanowe, siarczanowe, chlorkowe, węglanowe i tym podobne.

Pierwiastki drugorzędne, potrzebne do optymalnego wzrostu i rozwoju mikroorganizmu, z którego wytwarza się antybiotyk A204, wprowadza się także do pożywki. Pierwiastki takie występują zwykle jako domieszki z innymi składnikami środowiska odżywczego w ilościach odpowiednich do zapotrzebowania przez antynomycety stosowane w procesie prowadzonym sposobem według wynalazku.

Początkowa wartość pH środowiska pożywkowego może się wahać w pewnych granicach, przy czym stwierdzono, że winna ona korzystnie wynosić 6,5—7,5. Jak zaobserwowano w przypadku innych aktywnomycetów, wartość pH pożywki wzrasta stopniowo podczas wzrostu szczepu i wytwarzania antybiotyku, przy czym może ona osiągać wartość 7,0—7,6 lub nawet wyższą, z tym, że końcowa wartość pH zależy co najmniej częściowo od wyjściowej wartości pH pożywki, substancji buforowych w tej pożywce oraz od czasu wzrostu mikroorganizmu.

Antybiotyk A204 wytwarza się korzystnie w zanurzeniowej hodowli aerobowej. W przypadku wytwarzania stosunkowo niewielkich ilości antybiotyku A204 można stosować kolbę wstrząsaną i prowadzić hodowlę powierzchniową w balonach, natomiast do wytwarzania większych ilości antybiotyku korzystniej stosuje się zanurzoną kulturę aerobową w sterylizowanych zbiornikach. Pożywka umieszczona w sterylnym zbiorniku może być zaszczepiona sporowaną zawiesiną. Ze względu jednak na to, iż metoda ta pociąga za sobą opóźnienie wzrostu, korzystniej jest stosować hodowlę w postaci wegetatywnej, która nie powoduje opóźnienia i wpływa tym samym na wydajniejsze wykorzystanie sprzętu do fermentacji. Zaleca się zatem najpierw wytworzyć szczepionkę wegetatywną przez zaszczepienie stosunkowo niewielkiej ilości pożywki mikroorganizmem w postaci sporów, a następnie zachowując warunki aseptyczne, przeniesie młodą, aktywną szczepionkę do dużego zbiornika. Pożywka, w której wytwarza się wegetatywną szczepionkę, może być tą samą pożywką lub różną od pożywki, stosowanej do produkcji antybiotyku A204 na dużą skalę.

Ponieważ szczep, z którego otrzymuje się antybiotyk A204, rozwija się w temperaturze 25—37°C, przy czym optymalną wydajność uzyskuje się w temperaturze 26—30°C, przez to hodowlę prowadzi się korzystnie w tej temperaturze. Ogólnie biorąc, maksymalną produkcję antybiotyku osiąga się po

upływie około 24—72 godzin po zaszczepieniu pożywki.

Jak zwykle w przypadku zanurzonych kultur aerobowych, przez pożywkę przepuszcza się sterylne powietrze. W celu uzyskania wydajnego wzrostu mikroorganizmu i wydajnej produkcji antybiotyku A204, przepuszcza się 0,2—0,4, a korzystnie 0,35 objętości powietrza na minutę w stosunku do objętości pożywki.

Aktywność antybiotykową w pożywce podczas fermentacji ustala się łatwo badając próbki tej pożywki na aktywność hamującą wzrost szczepów, których rozwój powstrzymuje obecność antybiotyku A204. Stwierdzono, że odpowiednimi do takiego badania szczepami są *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis* i *Mycobacterium avium*. Badanie prowadzi się znaną metodą turbidometryczną lub metodą kubkowo-płytkową.

Maksymalną wydajność antybiotyku A204 uzyskuje się na ogół w ciągu 2—3 dni po zaszczepieniu pożywki, zarówno w przypadku zanurzonej kultury aerobowej, jak i w przypadku stosowania wstrząsanego balonu.

Aktywność antybiotykowa podczas fermentacji występuje w roztworze, w grzybni lub w obu tych miejscach. Technikę wyosabniania produktu dobiera się tak, aby otrzymać najwyższą wydajność antybiotyku z każdego z tych źródeł lub z obu źródeł jednocześnie. Na przykład, wytworzony roztwór fermentacyjny przesącza się, a przesącz ekstrahuje odpowiednim rozpuszczalnikiem w celu wyosobnienia całego aktywnego antybiotyku, nie zatrzymanego przez grzybnie. Poza tym, antybiotyk zawarty w grzybni wyosabnia się również przez dokładne ekstrahowanie odpowiednim rozpuszczalnikiem. W obu przypadkach antybiotyk wyosabnia się z rozpuszczalnika ekstrakcyjnego metodami stosowanymi zwykle do tego celu.

Chemiczna i fizyczna analiza krystalicznego A204 wykazuje obecność 4—5 grup metoksyłowych.

Chromatografia bibułowa antybiotyku A204 z zastosowaniem papierka Whatmana nr 1 daje następujące wartości R_f : 0,14 — w wodzie, metanolu, acetonie i benzenie w stosunku objętościowym 72:24,5:3:0,5; 0,87 — w 10% wodnym roztworze n-propanolu, 0,33 — w rozpuszczalniku zawierającym wodę, metanol i kwas octowy w stosunku 12:3:1 (wartość pH roztworu ustalono na 10,5 przez dodanie NH_4OH , a następnie na 7,3 przez dodanie H_3PO_4). Powyższe dane uzyskano z zastosowaniem roztworu antybiotyku w metanolu. Bioautografy otrzymano umieszczając chromatogram bibułowy na płytkach agarowych zaszczepionych testowym szczepem *Bacillus subtilis*. Przy poddaniu antybiotyku A204 chromatografii cienkowarstwowej na płytkach żelu krzemionkowego z zastosowaniem octanu etylu jako rozpuszczalnika oraz natrysku wanilinowego lub natrysku kwasu siarkowego jako detektora, otrzymuje się wartość R_f około 0,8. Widmo absorpcyjne antybiotyku A204 w podczerwieni podano na fig. 1 rysunku.

Sodowa sól antybiotyku A204 jest krystaliczną substancją o barwie białej i o temperaturze topnienia 144—145°C i ciężarze cząsteczkowym, wy-

znaczonym drogą analizy rentgenograficznej, wynoszącym około 960. Sól ta rozpuszcza się w estrach, benzenie, chlorowcowanych węglowodorach, dwumetyloformamidzie, dwumetylosulfotlenku, eterze i ketonach i jest słabo rozpuszczalna w alkoholach.

Optyczna skręcalność właściwa $(\alpha)_{\text{D}}^{25^\circ}$ krystalicznej

soli sodowej antybiotyku A204, suszonej w ciągu około 15 godzin nad bezwodnym chlorkiem wapnia w temperaturze pokojowej i pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego, wynosi +54,95° ($C = 2\%$ wag./obj. w metanolu).

Widmo absorpcyjne soli sodowej antybiotyku A204 w podczerwieni w chloroformie pokazano na fig. 2 rysunku. Wyraźne pasma tego widma przy długości fali 2,0—15,0 mikronów są następujące: 3,1—3,2 (szerokie), 3,44, 6,26, 6,87, 7,29, 7,67, 7,79, 8,45, 8,96, 9,11, 9,18, 9,36, 9,56, 9,82, 10,05, 10,26, 10,54, 10,95, 11,77 mikronów.

Ciężar cząsteczkowy uwodnionej krystalicznej soli srebrowej antybiotyku A204, wyznaczony drogą analizy rentgenograficznej, wynosi około 1099. Kryształy soli srebrowej są bezbarwne, lecz wrażliwe na działanie światła i promienie X, przy czym po 25 dniach napromieniowania na powietrzu stają się ciemnobrunatne. Ciężar właściwy soli srebrowej, mierzony drogą flotacji w wodnym roztworze ZnCl_2 wynosi 1,293 g/cm³. Jedyną zasadą ekstrakcji jest $\text{hkl} : h + k = \text{Zn}$, co wskazuje na niecentryczną, jednoskośną grupę przestrzenną C_2 . W komórce elementarnej o wymiarach: $a = 25,977\text{\AA}$, $b = 14,517\text{\AA}$, $C = 14,418\text{\AA}$, $B = 91,94\text{\AA}$ znajdują się 4 asymetryczne komórki jednoskośne i jedna cząsteczka na komórkę asymetryczną.

Podobnie, jak wiele innych antybiotyków, antybiotyk A204 zawiera niekiedy kilka ściśle pokrewnych składników. Obecność drugiego składnika stwierdzono tylko w niektórych procesach fermentacyjnych, w ilości do 5% całości produktu. Ten drugi występujący niekiedy składnik nazwano A204II. Dotychczas A204II otrzymano tylko w postaci mieszanej soli sodowo-potasowej, której aktywność jest podobna do aktywności antybiotyku A204.

Przeciętna z kilku analiz elementarnych krystalicznej mieszanej soli sodowo-potasowej A204II, wysuszonej nad pięciotlenkiem fosforu w temperaturze około 80°C pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego, wykazuje obecność 60,66% węgla, 8,76% wodoru i 27,09% tlenu. Kilka atomowych analiz absorpcyjnych wykazało, że związek jest mieszaną solą sodowo-potasową o różnych proporcjach składników, zawierającą jeden mol kationu mieszanego na 1 mol A204. Mieszana sól sodowo-potasowa A204II nie wykazuje żadnego charakterystycznego układu w nadfioletowym widmie absorpcyjnym. Chromatografia cienkowarstwowa mieszanej soli sodowo-potasowej antybiotyku A204II na płytkach żelu krzemionkowego, z zastosowaniem octanu etylu jako rozpuszczalnika i kwasu siarkowego jako detektora, wykazała wartość $R_f = 0,75$.

Antybiotyk, wytwarzany sposobem według wynalazku, ma zastosowanie przemysłowe i farmaceutyczne, medyczne i weterynaryjne. W celu otrzymania odpowiedniego preparatu szkodnikobójczego

miesza się zwykle aktywne związki z odpowiednimi znanymi nośnikami.

Antybiotyk A204 i jego sole wykazują wysoką aktywność wobec zakażenia kokcydiozowego w przypadku wprowadzenia ich do pokarmu kurcząt. Stwierdzono, że zawartość 9—45 g antybiotyku A204 lub jego soli na 1 tonę pokarmu skutecznie zwalcza oddzielne zakażenia *E. tenella*, *E. acervulina* i *E. maxima*. Ta sama ilość zwalcza mieszane zakażenia *E. brunetti* i *E. tenella* oraz mieszane zakażenia 8 gatunkami kokcydów (*Coccivac D*).

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku wykazują również aktywność owado- i roztoczbójczą oraz hamują rozwój mikroorganizmów wywołujących choroby u zwierząt i roślin, w tym także rozwój bakterii Gram-dodatnich i grzybów. Antybiotyki wprowadzone do roztworów dezynfekujących mają zastosowanie do dezynfekowania powierzchni wokół basenów kąpielowych, budynków gospodarczych, pomieszczeń dla inwentarza żywego i tym podobnych i do utrzymywania tych miejsc w stanie wolnym od bakterii i grzybów.

Związki wytwarzane sposobem według wynalazku wykazują również aktywność wobec pleśni roślin strączkowych i pewnych szkodników kukurydzy, w stężeniu 16—400 części/milion, a zatem mają one zastosowanie do zwalczania tych szkodników.

Owadobójcze i roztoczbójcze właściwości antybiotyku A204 przedstawiono w tablicy II, w której zastosowano następującą skalę.

Procentowa śmiertelność	Moc
0— 10	0
11— 20	1
21— 30	2
31— 40	3
41— 50	4
51— 60	5
61— 70	6
71— 80	7
81— 90	8
91—100	9

Aktywność antybiotyku w stosunku do pewnych mikroorganizmów określa się przez badanie rozcieńczalności agaru, polegające na tym, że badany szczep nakłada się na szereg płytek agarowych zawierających różne stężenia antybiotyku A204, w celu ustalenia minimalnego stężenia w mcg/ml., hamującego rozwój szczepu w ciągu 24 godzin.

Tablica III

Szczep badany	Minimalne stężenie w mcg/ml 24 godziny działania
<i>Staphylococcus aureus</i> (3055)	6,25
<i>Bacillus subtilis</i> (X12-1)	6,25
<i>Mycobacterium avium</i> (X-85)	1,56
<i>Streptococcus faecalis</i>	1,56
<i>Lactobacillus casei</i>	1,56
<i>Leuconostoc citrovorum</i>	0,39
<i>Trichophyton mantagrophytes</i>	25,00
<i>Xanthomonas phaseoli</i>	100,00
<i>Botritis cinerea</i>	100,00
<i>Colletotrichum pisi</i>	100,00
<i>Helminthosporium sativum</i>	100,00
<i>Fellularia</i> sp.	100,00
<i>N. gruberi</i> (HB-1) w tkance MK ₂	100,00

Sól sodowa antybiotyku A204 w postaci wolnego kwasu wykazuje podobną aktywność in vitro.

Przykład I. Wytwarzanie antybiotyku A204 w kolbie wstrząsowej. Spory *Streptomyces albus* NRRL 3384 zaszczenia się na skórkach agarowych z 10 g dekstryny, 2 g kazeiny przefermentowanej przez enzymy, 1 g ekstraktu słodowego, 1 g ekstraktu drożdżowego, 20 g agaru i wody do objętości całkowitej wynoszącej 1 litr, po czym inkubuje się zaszczone skosy w ciągu 4—5 dni w temperaturze 30°C. Następnie pokrywa się skosy sterylną wodą destylowaną i delikatnie zeszkrobuje z nich

Tablica II

Skuteczność antybiotyku A204 jako środka owadobójczego

Owad	Działanie	Moc przy stężeniu w częściach na milion					
		1000	500	250	100	50	25
Meksykański szkodnik roślin strączkowych (Mexican Bean Beetle)	żołądkowe	8	4	0	—	—	—
Szkodnik roślin w Ameryce i Azji (Southern Army Worm)	żołądkowe	8	9	8	8,5	3,5	3
Mszycyca kruszynowo-ogórkowa (Melon Aphid)	kontaktowe	3,5	2	1	—	—	—
Roztocz dwukropek (Two-spotted Spider Mite)	systemowe	7	0	0	—	—	—
Chrzyszcz trojeściowy (Milkweed Bug)	kontaktowe	9	7	7	8	7	6
	kontaktowe	9	9	4	3	1	2

ustroje w celu wytworzenia ich wodnej zawiesiny. Każde 100 ml pożywki vegetatywnej zaszczepia się 1 ml otrzymanej zawiesiny.

Pożywkę vegetatywną wytwarza się przez zmieszanie 15 g glikozy, 15 g mączki sojowej, 5 g stałych substancji z wyciągu kukurydzy, 5 g chlorku sodowego, 2 g węglanu wapnia i wody bieżącej w ilości dopełniającej całość do objętości 1 litra. Mieszaninę tę wstrząsa się w ciągu 48 godzin w temperaturze 30°C na wstrząsarce posuwisto-zwrotnej o skoku 5 cm przy 108 obr./min. Otrzymaną pożywkę stosuje się do wytwarzania antybiotyku A204 jak następuje. Najpierw wytwarza się mieszaninę zawierającą 15 g mączki sojowej, 1 g kazeiny, 3 g NaNO_3 , 20 g syropu glikozowego, 2,5 g CaCO_3 i wodę w ilości dopełniającej całość do objętości 1 litra. 100 ml porcji tej mieszaniny umieszcza się w kolbach Erlenmeyera o pojemności po 500 ml i kolby te sterylizuje następnie w temperaturze 120°C w ciągu 30 minut. Po ochłodzeniu, każdą kolbę zaszczepia się 5% wytworzonej uprzednio pożywki vegetatywnej. Przygotowane jak wyżej kolby wstrząsa się w ciągu 48 godzin w temperaturze 30°C na wstrząsarce obrotowej o 250 obr./min., przy czym wartość pH niezaszczepionej pożywki wynosi 6,5—7,5. Po zakończeniu cyklu fermentacyjnego, wartość pH wynosi 7,0—7,6. Aktywność antybiotyku stwierdza się zarówno w roztworze jak i w grzybni, badając roztwór i grzybnie wobec *Bacillus subtilis* metodą talerzową lub kubkowo-płytkową.

25 litrów brzezki wytworzonej w powyższy sposób przesącza się pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego przez ziemię okrzemkową, po czym trzykrotnie ekstrahuje się placek grzybniowy 0,5 objętości 50% wodnego roztworu metanolu. Połączone ekstrakty stęją się pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego w celu usunięcia metanolu. Następnie miesza się przefiltrowany roztwór z wodnym koncentratem ekstraktów grzybniowych, wartość pH otrzymanej mieszaniny ustala na 3 przez dodanie kwasu solnego i ekstrahuje roztwór dwukrotnie 0,5 objętości octanu etylu. Ekstrakty octanowe łączy się i stęją do sucha, po czym ponownie rozpuszcza w chloroformie (10 g chloroformu na 1 g substancji stałej) i przepuszcza się otrzymany roztwór przez 30×100 cm kolumnę węgla pit-sburgskiego o zawartości 2 g węgla na 1 g substancji stałej, a następnie eluuje kolumnę 5—10-krotną ilością chloroformu w stosunku do ilości wyjściowej.

Połączone eluaty stęją się do stanu suchego pod ciśnieniem niższym od atmosferycznego, pozostałość rozpuszcza w niewielkiej ilości ciepłego metanolu i ochładza, a następnie odsacza wytworzone kryształy. Po rekrytalizacji otrzymuje się 8,9 g kryształów antybiotyku A204 o mocy 1200—1400 jednostek mikrobiologicznych na 1 mg. Kryształy identyfikuje się przez analizę magnetycznego rezonansu jądrowego, widma w podczerwieni, chromatografii cienkowarstwowej i chromatografii bibulowej jako antybiotyk A204 o temperaturze topnienia 96—98°C.

Przykład II. Wytwarzanie antybiotyku A204.

Antybiotyk A204 wytwarza się, jak w przykładzie I, z tym, że stosuje się mieszaninę o składzie:

15 g glikozy, 15 g mączki sojowej, 5 g substancji stałej z wyciągu kukurydzianego, 5 g NaCl , 2 g CaCO_3 i woda do objętości całkowitej 1 litra. Wytworzony produkt identyfikuje się jako antybiotyk A204 o temperaturze topnienia 96—98°C.

Przykład III. Antybiotyk A204 wytwarza się, jak w przykładzie I, z tym, że stosuje się mieszaninę o składzie: 20 g glikozy, 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 8 g CaCO_3 , 4 g KCl , 0,4 g KH_2PO_4 , 5 g mączki sojowej i woda do całkowitej objętości 1 litra. Wytworzony produkt identyfikuje się jako A204 o temperaturze topnienia 96—98°C.

Przykład IV. Antybiotyk A204 wytwarza się, jak w przykładzie I, z tym, że stosuje się mieszaninę o składzie: 10 g glikozy, 20 g melasy jadalnej, 5 g peptonu, 2 g CaCO_3 i woda do całkowitej objętości 1 litra. Wytworzony produkt identyfikuje się jako A204 o temperaturze topnienia 96—98°C.

Przykład V. Wytwarzanie antybiotyku A204 na skalę półprzemysłową.

Antybiotyk A204 wytwarza się metodą fermentacji w zanurzeniu na skalę półprzemysłową jak następuje. 250 ml kolbę zawierającą 50 ml pożywki vegetatywnej o zawartości 10 g/litr dekstrozy, 25 g/litr rozpuszczalnej skrobi, 15 g/litr ziaren sojowych, 10 g/litr wyciągu namokowego kukurydzy i 2 g/litr CaCO_3 w wodzie bieżącej, po ustaleniu wartości pH na 6,5 za pomocą NaOH , zaszczepia się 5% zawiesiną wytworzoną, jak opisano w przykładzie I, z kultury na skosach agarowych, zawierającej 10 g glikozy, 10 g ekstraktu drożdżowego, 5 g NaCl , 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ i 20 g trzykrotnie wypłukanego agaru Meera w 1 litrze odjonizowanej wody. Zaszczepioną pożywką inkubuje się w ciągu 48 godzin w temperaturze 30°C na wstrząsarce obrotowej o średnicy łuku 5 cm i 250 obr./min. 16 ml wytworzonej kultury zaszczepia się 1-litrową kolbę zawierającą 200 ml pożywki vegetatywnej, po czym pożywkę tę inkubuje się w ciągu 30 godzin w temperaturze około 30°C na wstrząsarce obrotowej o średnicy łuku 5 cm i 250 obr./min. 200 ml wytworzonej kultury zaszczepia się 40-litrową kadź zawierającą 25 litrów sterylizowanego wodnego roztworu fermentacyjnego, zawierającego 0,2 g/litr środka przeciw pienieniu, 25 g/litr dekstrozy, 15 g/litr ziaren sojowych, 3 g/litr końcowej czarnej melasy, 1 g/litr kazeiny i 2,5 g/litr CaCO_3 w wodzie bieżącej. Po zaszczepieniu prowadzi się fermentację w temperaturze 30°C w ciągu 30 godzin, przy czym w ciągu całego okresu fermentacyjnego miesza się z prędkością 420 obr./min. i napowietrza z prędkością 0,4 cm^3 powietrza na 1 cm^3 mieszaniny fermentacyjnej na minutę. Wytworzony produkt wyosabia się, jak w przykładzie I, po czym identyfikuje się go jako antybiotyk A204 o temperaturze topnienia 96—98°C.

Przykład VI. Wytwarzanie soli antybiotyku A204 z brzezki i z grzybni.

Sól metalu alkalicznego, sól amonową i aminową antybiotyku A204 wytwarza się z roztworu i grzybni, jak w przykładzie VII, przez ustalenie wartości pH mieszaniny przefiltrowanego roztworu i wodnego koncentratu ekstraktu grzybniowego za pomocą odpowiedniego wodorotlenku metalu alka-

licznego, wodorotlenku amonowego lub wodorotlenku aminy, dwukrotne ekstrahowanie 0,5 objętości octanu etylu, a następnie postępowanie, jak wyżej.

Kwas i jego sole również można krystalizować z wielu ketonów, estrów, alkoholi i mieszanin benzenowo-węglowodorowych lub oczyszczać innymi znanymi metodami, takimi, jak chromatografia kolumnowa i tym podobne.

Przykład VII. Wytwarzanie soli sodowej antybiotyku A204.

Do 100 mg wytworzonego w przykładzie I antybiotyku A204, rozpuszczonego w 1 ml acetonu, dodaje się 1 kroplę 5 n roztworu NaOH i 1 ml wody. Mieszaninę tę klaruje się przez lekkie ogrzewanie, po czym pozostawia ją w temperaturze -15°C do momentu rozpoczęcia krystalizacji. Następnie odsącza się kryształy i po przekrystalizowaniu z wodnego roztworu alkoholu otrzymuje się 72 mg sodowej soli antybiotyku A204 o temperaturze topnienia $144-145^{\circ}\text{C}$.

Przykład VIII. Wytwarzanie soli potasowej antybiotyku A204.

Potasową sól A204 wytwarza się postępując, jak w przykładzie VII, z tym, że kroplę 5 n roztworu NaOH zastępuje się kroplą 5 n roztworu KOH.

Przykład IX. Wytwarzanie soli srebrowej antybiotyku A204.

670 mg soli sodowej antybiotyku A204 rozpuszcza się w 40 ml metanolu, miesza z roztworem 270 mg azotanu srebra w 2 ml wody i pozostawia w ciemności w temperaturze pokojowej na okres 3 dni. Następnie odparowuje się mieszaninę do sucha i płucze wodą w celu usunięcia nadmiaru azotanu srebra. Pozostałość rozpuszcza się w 10 ml ciepłego metanolu, filtruje na gorąco przez lejek z filtrem ze spiekanego szkła i pozostawia w temperaturze 50°C na okres 16 godzin. Otrzymane duże, białe, prostopadłościennne kryształy soli srebrowej antybiotyku A204 przekrystalizowuje się z wodnego roztworu acetonu, otrzymując 450 mg srebrowej soli A204. Analiza rentgenograficzna wykazuje gęstość soli około 1099.

Przykład X. Oddzielanie antybiotyku A204 od A204II.

100 g mieszanej sodowo-potasowej soli antybiotyku A204, wytworzonej w przykładzie VI, roz-

puszcza się w 500 ml mieszaniny benzenu z octanem etylu o stosunku 7:3, po czym roztwór poddaje się chromatografii kolumnowej w kolumnie zawierającej 2000 g żelu krzemionkowego. Do eluowania stosuje się mieszaninę benzenu z octanem etylu w stosunku 7:3, a po eluowaniu dokonuje się cienkowarstwowej chromatografii na żelu krzemionkowym, z zastosowaniem octanu etylu jako rozpuszczalnika i kwasu siarkowego jako detektora. Jako pierwszy eluuje się A204. Po zebraniu około 32 litrów rozpuszczalnika, rozpuszczalnik zmienia się na mieszaninę benzenu z octanem etylu w stosunku 1:1 i kontynuuje eluowanie do momentu zniknięcia plamek na płytkach żelu krzemionkowego.

Frację zawierającą duże stężenia A204II miesza się, stęża do sucha i krystalizuje z mieszaniny acetonu z wodą. Otrzymane 3 g kryształów chromatografuje się ponownie na kolumnie, zawierającej 21 g żelu krzemionkowego, w mieszaninie benzenu z octanem etylu w stosunku 7:3 i ponownie eluuje metodą chromatografii cienkowarstwowej. Frację, zawierającą wyłącznie A204II, miesza się, odparowuje do sucha i krystalizuje z mieszaniny acetonu z wodą, otrzymując 788 mg krystalicznego antybiotyku A204II o temperaturze topnienia $177-179^{\circ}\text{C}$ i aktywności odpowiadającej 1550 jednostkom A204 na 1 ml. Frację zawierającą antybiotyki A204 przerabia się w sposób opisany w przykładzie I.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowego antybiotyku A204, **znamienny tym**, że szczep *Streptomyces albus* NRRL 3384 poddaje się hodowli w środowisku zawierającym źródła przyswajalnego węgla, azotu i nieorganicznych soli, prowadząc hodowlę zainoczeniową w warunkach aerobowych, w temperaturze około $25-37^{\circ}\text{C}$ w ciągu około 24-72 godzin, po czym ze środowiska wyosabia się antybiotyki A204 w postaci wolnej lub w postaci soli.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że antybiotyki A204 wyosabia się z brzeczki pohodowlanej w postaci soli z metalem alkalicznym, metalem ziem alkalicznych lub soli z zasadą zawierającą azot.

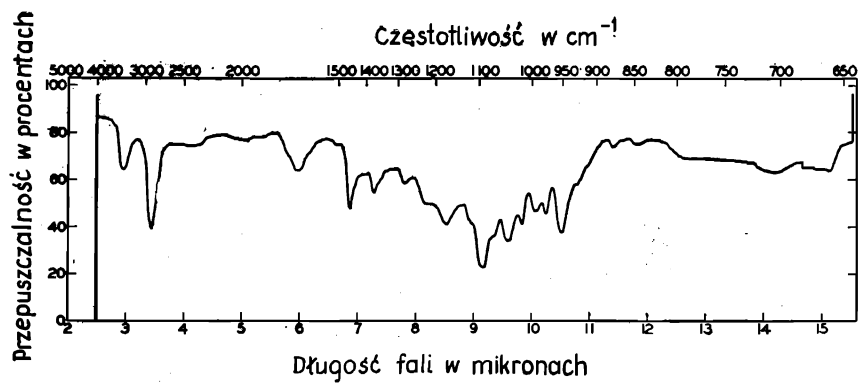


FIG. 1

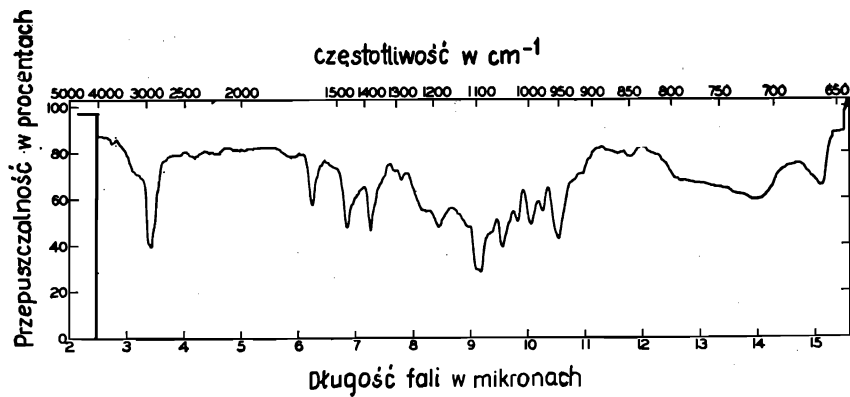


FIG. 2

