



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

Patent dodatkowy
do patentu _____

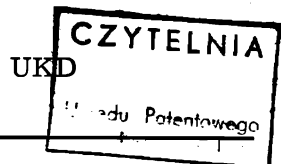
Zgłoszono: 17.IX.1964 (P 105 751)

Pierwszeństwo: 19.IX.1963 Francja

Opublikowano: 10.II.1970

Kl. 30 h, 6

MKP C 12 d 9/14



Właściciel patentu: Rhône — Poulenc S.A., Paryż (Francja)

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku

1

Wynalazek dotyczy wytwarzania nowego antybiotyku, określanego w dalszej części opisu numerem 11.837 R.P. Ten nowy produkt ma specjalne znaczenie ze względu na swą silną aktywność bakteriobójczą w stosunku do bakterii Gram-dodatnich. Otrzymuje się go ze środowisk hodowli sztucznej mikroorganizmu opisanego dokładnie poniżej, a należącego do grupy *Streptomyces* i oznaczonego przez „*Streptomyces vividans* DS 9466” (NRRL 3087).

Antybiotyk 11.837 R.P. łatwo rozpuszcza się w wodzie, rozpuszcza się w metanolu, pirydynie, kwasie octowym, dwumetyloformamidzie, słabo lub nie rozpuszcza się w etanolu, acetonie, chloroformie oraz n-heksanie.

W roztworze wodnym antybiotyk 11.837 R.P. jest bardzo trwały przy wartości pH = 5—10 (po 2 tygodniach przechowywania w temperaturze 37°C zachowuje co najmniej 90% swej aktywności), jest średnio trwały przy wartości pH = 4 (w ciągu 2 tygodni w temperaturze 37°C traci 30% aktywności), a stosunkowo nietrwały jest przy wartości pH = 2 (utrata 70% swej aktywności w ciągu 6 dni w temperaturze 37°C).

Antybiotyk 11.837 R.P. daje negatywne próby w następujących reakcjach: w reakcji biuretovej, w reakcji chlorku żelazowego, w reakcji ninhydrynowej. Pozytywne próby daje w następujących reakcjach: w reakcji ninhydrynowej po hydrolizie kwasowej, w reakcji dwuazowania, w reakcji

2

ksantoproteinowej, w reakcji z azotanem srebrowo-amonowym (wątpliwa przed hydrolizą i bardzo wyraźna po hydrolizie kwasowej), w reakcji floroglucyny, w reakcji karbazolu, w reakcji z nadmanganianem potasowym, w reakcji Benedict'a po hydrolizie kwasowej. Antybiotyk ten zabarwia na pomarańczowo stężony kwas siarkowy, a na kolor blaooróżowy stężony kwas solny.

Antybiotyk 11.837 R.P. jest mocnym kwasem, którego równoważnik kwasowy oznaczony za pomocą potencjometrycznego miareczkowania roztworem wodorotlenku sodowego wynosi 600 (pKa = 4,1). Ciężar cząsteczkowy antybiotyku jest wyższy od 5.000 ponieważ nie dializuje przez błonę z regenerowanej celulozy.

Antybiotyk 11.837 R.P. zawiera węgiel, wodór, tlen, azot i fosfor. Jego skład elementarny wyprowadzony na podstawie analizy jego soli sodowej jest zbliżony do następującego:

C = 46,9% H = 7,9% O = 39,2% N = 3,9% P = 2,22%.

Charakteryzuje się on następującymi właściwościami fizycznymi:

Wygląd: proszek bezpostaciowy biały

Temperatura topnienia: nie ma wyraźnego topnienia, rozkłada się następuje przy 160°C

Widmo w podczerwieni (oznaczenia wykonano na pastylkach z KBr) przedstawiono na załączonym wykresie fig. 1, na którym na osi odciętychznaczono długości fal w mikronach (skala niższa). Na wyższej skali na osi odciętych oznaczono liczbę

falową w cm^{-1} , a na osi rzędnych wielkość transmisji wyrażoną w procentach.

W tablicy I podano główne pasma absorpcyjne w podczerwieni dla tego produktu.

Tablica I

3360 tF	1164 m	tF — absorpcja	bardzo silna
2930 F	1125 ép	F — „	silna
1720 F	1100 m	m — „	średnia
1630 tF	1068 tF	f — „	słaba
1564 m	1040 tF	ép — „	przebiegię
1550 F	968 m		
	1430 ép		950 m
	1400 ép		890 f
	1380 F		860 f
	1330 m		800 f
	1222 F		

Sól sodowa antybiotyku 11.837 R.P. ma następujący skład elementarny:

C = 45,0% H = 7,4% O = 37,6% N = 3,72% P = 2,16% Na = 4,15%.

Charakteryzuje się ona następującymi właściwościami fizycznymi:

Wygląd: proszek bezpostaciowy praktycznie biały

Skręcalność: $(\alpha)_D^{22} = 6^\circ \pm 1$ (c = 0,6 woda)

Widmo w ultrafiolecie: (oznaczenie wykonano wychodząc z roztworu zawierającego 30 mg tej soli w 1 l wody).

Koniec absorpcji: $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 30$ przy 220 mμ

$E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 3,5$ przy 257 mμ

Widmo w podczerwieni (oznaczenie wykonano na pastylkach z KBr) przedstawiono na załączonym wykresie fig. 2, na którym na osi odciętych oznaczono długości fal w mikromach (skala niższa). Na wyższej skali osi odciętych oznaczono liczbę falową w cm^{-1} , a na osi rzędnych wielkość transmisji wyrażoną w procentach.

W tablicy II podano główne pasma absorpcyjne w podczerwieni dla tego produktu.

Tablica II

3400 tF	1160 m	tF — absorpcja	bardzo silna
2910 F	1100 m	F — „	silna
1730 tF	1062 tF	m — „	średnia
1547 m	1042 ép	f — „	słaba
1525 F	1030 ép	ép — „	przebiegię
ok. 1430 ép	972 m		
	1378 F		947 m
	1330 m		890 f
	1238 m		860 f

Aktywność bakteriostatyczną antybiotyku 11.837 R.P. w stosunku do bakterii określono za pomocą jednej z metod rozcieńczania, stosowanych do tego celu. Dla każdego rodzaju bakterii określono najmniejsze stężenie substancji, która w określonych warunkach, wstrzymuje całkowicie dający się zauważyć rozwój w odpowiednim bulionie — pożywce. Wyniki różnych oznaczeń podano w przytoczonej poniżej tablicy III, w której minimalne stężenia bakteriostatyczne wyrażone są w mikrogramach substancji na cm^3 badanego środowiska.

Z tych różnych oznaczeń wynika, że antybiotyk 11.837 R.P. oddziałuje głównie na bakterie Gram-dodatnie. Zwłaszcza działa on silnie na *Streptococcus hemolyticus*. Stosunkowo słabo działa na

bakterie Gram-ujemne, aczkolwiek na mikroorganizmy *Neisseria catarrhalis*, *Neisseria gonorrhoeae* i *Brucella abortus bovis* działa dosyć znacznie. Nie wykazuje on żadnego uodpornienia sprzężonego z następującymi antybiotykami: penicyliną, streptomycyną, tetracykliną, chloramfenikolem, spiramycyną, karbomycyną, erytromycyną, pristinamycyną i nowobiocyną. Wyniki różnych oznaczeń działania stężeń bakteriostatycznych antybiotyku 11.837 R.P. na różne szczepy stafylokokowe, wykazujące odporność na jeden lub kilka antybiotyków wymienionych powyżej podano w tabeli IV, w której stężenia bakteriostatyczne odnoszą się do trzech szczepów stafylokokowych, czułych na te wszystkie antybiotyki i podanych w tablicy III.

Tablica III

Badane organizmy bakteryjne	Minimalne stężenia bakteriostatyczne ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)
<i>Staphylococcus aureus</i> , szczep 209 P-ATCC 6538 P	0,15
<i>Staphylococcus aureus</i> , szczep 133 (Instytut Pasteura)	0,15
<i>Staphylococcus aureus</i> , szczep Smith	0,35
<i>Sarcina lutea</i> — ATCC 9341	150
<i>Streptococcus faecalis</i> — ATCC 9790	50
<i>Streptococcus viridans</i> (Instytut Pasteura)	0,6
<i>Streptococcus pyogenes hemolyticus</i> (szczep Dig 7, Instytut Pasteura)	0,005
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (A 50 — Instytut Pasteura)	1,25
<i>Diplococcus pneumoniae</i> (szczep Til, Instytut Pasteura)	0,03
<i>Bacillus subtilis</i> — ATCC 6633	3
<i>Bacillus cereus</i> — ATCC 6630	0,03
<i>Mycobacterium species</i> — ATCC 607	35
<i>Mycobacterium para-smegmatis</i> (A 75 — Lausanne)	65
<i>Escherichia coli</i> — ATCC 9637	35
<i>Shigella dysenteriae</i> — Shiga L (Instytut Pasteura)	40
<i>Salmonella paratyphi</i> A (Lacasse, Instytut Pasteura)	55
<i>Salmonella schottmuelleri</i> (paratyphi B) Fougenc (Instytut Pasteura)	30
<i>Proteus vulgaris</i> — A 244	165
<i>Klebsiella pneumoniae</i> — ATCC 10.031	60
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (szczep Bass — Instytut Pasteura)	40
<i>Brucella bronchiseptica</i> (CN — 387 Wellcome Instytut)	9
<i>Brucella abortus bovis</i> B 19	2,5
<i>Pasteurella multocida</i> (A 125, Instytut Pasteura)	1,5
<i>Treponema Reitera</i>	20

Tablica IV

Badane szczepy (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Minimalne stężenia bakterio-statyczne ($\mu\text{g}/\text{cm}^3$)
— szczep 209 P-ATCC 6538 P (s)	0,15
— szczep 209 P uodporniony na spiramycynę	0,2
— szczep 209 P uodporniony na karbomycynę	0,15
— szczep 209 P uodporniony na pristynamycynę	0,25
— szczep 209 P uodporniony na nowobiocynę	0,1
— szczep 133 (Instytut Pasteura) (s)	0,15
— szczep Smith (s)	0,35
— szczep B ₃ (odporny na penicylinę i streptomycynę)	0,2
— szczep Hb (odporny na penicylinę i tetracyklinę)	0,3
— szczep Beaujon 3 (odporny na penicylinę, na streptomycynę, na tetracyklinę i na chloramfenikol)	0,3
— szczep MB I (odporny na penicylinę i na erytromycynę)	0,1
— szczep Lavault (odporny na penicylinę, na erytromycynę i na spiramycynę)	0,1

Aktywność antybakteryjna antybiotyku 11.837 R.P. została stwierdzona „in vivo” na zwierzętach, poddawanych badaniom laboratoryjnym zakażonych eksperymentalnie bakteriami takimi jak streptokoki, pneumokoki, stafylokoki i *Neisseria* (N. meningitidis). Antybiotyk ten jest zwłaszcza skuteczny u myszy przy podawaniu pozajelitowym, przy czym skuteczność przy podawaniu dożylnym jest 2 razy silniejsza, niż przy podawaniu podskórnym. Działanie jego jest bardzo długie, dzięki czemu jest on bardzo dobrym środkiem zapobiegawczym. Działanie zapobiegawcze wykazano wobec zakażeń stafylokokami i streptokokami u myszy. Tak na przykład dawką 250 mg/kg, podawaną dożylnie antybiotyk 11.837 R.P. zabezpiecza wszystkie myszy przed infekcją pozajelitową streptokokiem następującą w 56 dni po jednorazowym przyjęciu tego środka. Przy takiej samej dawce (250 mg/kg), lecz podawanej podskórną, benzatyna — penicylina G zabezpiecza myszy tylko w ciągu 24 godzin.

Toksyczność antybiotyku 11.837 R.P. badano głównie u myszy. Dawką śmiertelną 50% lub DL_{50} określano przez podawanie produktu podskórną i dożylną.

DL_{50} = 1,7 g/kg podskórną

DL_{50} = 1,5 g/kg dożylną

Wyniki te wskazują, że produkt jest bardzo mało toksyczny.

Organizm, wytwarzający antybiotyk 11.837 R.P. należy do gatunku *Streptomyces* i określany jest nazwą „*Streptomyces viridans* DS 9466”. Jest on zdeponowany w laboratorium NRRL w Peorii Ill. Stany Zjednoczone Ameryki pod numerem „NRRL 3087”.

Organizm ten został wyisobniony z próbki ziemi pobranej koło Madras w Indiach.

Sposób wyisobnienia jego jest następujący: z pobranej ziemi tworzy się zawiesinę w destylowanej, wyjałowionej wodzie, po czym zawiesinę rozcieńcza do uzyskania różnych stężeń. Z każdego rozcieńczenia małą objętość rozprowadza się na płytkach Petri'ego, zawierających pożywkę z agaru.

Po kilkudniowym okresie inkubacji w temperaturze 26°C kolonie mikroorganizmów, które chce się wyisobnić zaszczenia się na agarze — pożywkę, skośnie ustawioną w celu otrzymania większych ilości mikroorganizmów.

Przy zastosowaniu klasyfikacji Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (VII wydanie 1957) dla gatunku *Streptomyces*, a także klasyfikacji i opisów wskazanych przez S.A. Waksman'a w „The Actinomycetes” (The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1961) stwierdzono, że cechy morfologiczne organizmu wytwarzającego antybiotyk 11.837 R.P. odpowiadają tym, które podano dla *Streptomyces viridans*. Dlatego też organizm, wytwarzający antybiotyk 11.837 R.P., uznano jako należący do tego gatunku i nazwano go *Streptomyces viridans* DS 9466.

W tablicy V przeprowadzono porównanie cech szczepu *Streptomyces viridans* DS 9466 z gatunkiem *Streptomyces viridans*, określonym w „Bergey's Manual of Determinative Bacteriology” (VII wydanie 1957) (The Williams and Wilkins Company, Baltimore). Porównanie to wskazuje wyraźnie, że organizm wytwarzający antybiotyk 11.837 R.P. wykazuje cechy odpowiadające cechom *Streptomyces viridans*, a istniejące pewne małe różnice przypisywane są jedynie różnym szczepom tego samego gatunku.

Streptomyces viridans DS 9466 posiada właściwość wytwarzania w pewnych środowiskach hodowlanych, zwłaszcza w środowisku Bennett'a zielonego rozpuszczonego pigmentu, który na początku jego wytwarzania i wówczas, gdy wytworzony jest już w ilości wystarczającej, ma intensywne szmaragdowozielone zabarwienie. To wytwarzanie pigmentu zielonoszmaragdowego jest dość nieregularne i zależy zwłaszcza od stopnia posiewu mikroorganizmu w środowiskach, w których wytwarza się pigment. Obecność ziemi sprzyja wytwarzaniu pigmentu. Zielonoszmaragdowe zabarwienie substratu ulega zmianie. W miarę starzenia się hodowli, w zależności od środowiska hodowlanego i od ilości wytwarzanego pigmentu kolor substratu zmienia się na zielono-czarniawy lub zielono-brunatny lub brązowo-szarawy.

Tablica V

	Streptomyces viridans (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Wydanie VII, str. 758—759)	Streptomyces viridans DS 9466
Wzrost wegetatywny	Kolonie zielone do koloru brunatno-zielonego	Grzybnia wegetatywna żółtoszarawa do żółtego ostrego lub żółtobrunatnego. W niektórych ośrodkach zabarwia się na zielono przechodząc w kolor brązowo-zielony lub zielono-czarniawy w strefach, gdzie wytwarza się zielony rozpuszczalny pigment.
Grzybnia napowietrzna	Ciemnoszara zabarwiona na oliwkowo lub kolor szarozielony, aksamitna, pokrywa całą kolonię. Sporofory długie, tworzące spirale. Spory walcowate	Jasno-szara do ciemnaszarego, w postaci proszku, dobrze rozwinięta, sporofory długie, monopody, których fragmenty końcowe stanowią łańcuchy podatne do tworzenia rozgałęzień wzdłuż ich głównego pnia. Łańcuchy spor wygięte lub tworzące krótkie spirale. Spory walcowate
Zelatylna	Przejście w stan ciekły szybkie	Przejście w stan ciekły umiarkowane
Agar	Wzrost kolonii koloru brązowo-zielonego Tworzenie się rozpuszczalnego pigmentu brązowego	Wzrost wegetatywny żółty lub brunatnawy do brunatno-zielonego zależnie od środowiska. Brak rozpuszczalnego pigmentu lub brunatnawy; ponadto produkcja rozpuszczalnego zielonego pigmentu mniej lub więcej regularna
Agar syntetyczny	Kolonie zielone Wytwarzanie zielonego rozpuszczalnego pigmentu	Grzybnia wegetatywna żółtawa do brunatnej, zabarwiająca się na zielono z wytwarzaniem się zielonego, rozpuszczalnego pigmentu. Brak pigmentu rozpuszczalnego lub żółtawy do brunatnawego, najczęściej mało intensywny. W niektórych przypadkach wytwarza się zielony rozpuszczalny pigment w małych ilościach (agar z glice-

c.d. tablicy V

	Streptomyces viridans (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Wydanie VII, str. 758—759)	Streptomyces viridans DS 9466
5		
10		
15		ryny i asparaginą, agar ze skrobią Waksman) lub obficie (agar Czapska z gliceryną); zauważono, że w tym ostatnim przypadku wpływ wywiera obecność ziemi.
20	Mleko	koagulacja i szybka peptonizacja
25		Peptonizacja powolna, nie poprzedzona koagulacją w temperaturze 25°C, ze słabą koagulacją w temperaturze 37°C
30	Sacharoza	szybka inwersja
35	Skrobia	szybka hydroliza
40	Celuloza	wzrost ograniczony
45	Azotyny	aktywnie wytworzone z azotanów
50		wzrost dodatni
55		szybko i silnie wytworzone z azotanów
60	Właściwości antagonyzujące	brak
65		wytwarza antybiotyki 11.837 R. P.

Streptomyces viridans DS 9466 stanowi ustrój zarodnikowy, napowietrzny, barwy szarej dosyć ciemnej, dobrze rozwijający się w zwykłych środowiskach hodowlanych, a zwłaszcza w środowisku Bennett'a. Tworzy on spory walcowate o szerokości 0,7—0,9 μ i długości 1,3—1,5 μ . Jego sporofory są monopodialne. Tworzą one dosyć często ustrój rozgałęziony o skomplikowanej budowie. Niektóre nitki sporonośne mają jeden łańcuch spor, lecz często nitka napowietrzna zakończona jest pękiem kilku nitek sporonośnych, najczęściej 2—4, umieszczonych w tym samym punkcie na końcu nitki. Jedna lub kilka nitek umieszczonych na końcu nitki głównej mogą ewentualnie dzielić się z kolei w swej części końcowej, aby tworzyć także nowe grupy o 2—4 łańcuchach spor. Wzdłuż długości nitki głównej i nitek drugorzędnych można często zaobserwować powstałe rozgałęzienia, bądź jednej samej nitki sporonośnej, zakończonej jednym łańcuchem spor, bądź jednej nitki zakończonej kilkoma łańcuchami spor, umieszczonymi w jej punkcie końcowym, bądź czasami 2 lub 3 nit-

kami sporonośnymi, umieszczonymi w tym samym punkcie, które posiadają lub nie mają rozgałęzień końcowych. Łańcuchy spor są wygięte o końcówkach po prostu wygiętych, albo zwijają się zakreślając jeden lub dwa zwoje spiralne, które tworzą spirale na ogół otwarte.

Cechy hodowlane i właściwości biochemiczne *Streptomyces viridans* DS 9466 zostały zbadane na pożywkach agarowych i bulionach — pożywkach, zwykle stosowanych do określania wyglądu szczepów *Streptomyces*. Dokonane obserwacje podano na załączonej tablicy VI.

Dokładne dane dotyczą hodowli po 2—4 tygodniach inkubacji w temperaturze 26°C, doprowadzonych do dobrego stanu rozwojowego. Większość zastosowanych środowisk hodowlanych została przygotowana według danych zawartych w „The Actinomycetes” S. A. Waksman strona 193—197, Chronica Botanica Company, Waltham Mass. U.S.A. 1950 i w przypadku tym podano literę W z odpowiednim numerem z „The Actinomycetes”.

Skład środowisk hodowlanych lub odpowiednie odnośniki literaturowe dla tablicy VI podano w poniższym zestawieniu:

- A — K. L. Jones — Journal of Bacteriology, 57, 142 (1949)
- B — A. M. Williams i E. Mc COY — Applied Microbiology, I 307 (1953)
- C — GRUNDY i inni — Antibiotics and Chem, 2, 401 (1952)
- D — 0,5% peptonu, 0,3% ekstraktu mięsnego, 0,5% tyrozyny i 2% agaru
- E — sole nieorganiczne, skrobia z agarem — T. G. PRIDHAM i inni, Antibiotics Annual, 1956—1957, strony 947—953.
- F — odpowiada przepisowi W — 1, w którym 30 g sacharozy zastąpiono przez 15 g gliceryny
- G — „Żelatyna czysta” wytworzona według wskazówek z „Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria” — Society of American Bacteriologists, Geneva, N. Y. -11₅₀ -18.
- H — Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria — Society of American Bacteriologists, Geneva, N. Y. 11₅₀ -18.
- I — Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria — Society of American Bacteriologists, Geneva, N. Y. 11₅₀ -19.
- J — odpowiada przepisowi W — 18, w którym usunięto sacharozę i zastąpiono ją małymi pakami bibuły, zanurzonymi częściowo w cieczy.
- K — odciągane mleko w proszku, rekonstruowane według wskazówek producenta.
- L — H. D. TRESNER i F. DANGA — Journal of Bacteriology, 76, 239—244 (1958).

Według Pridham'a i Gottlieb'a — (J. of Bact. 56, 107—114, 1948), przy hodowli *Streptomyces viridans* DS 9466 odpowiednim źródłem węgla są następujące składniki: ksyloza, arabinioza, ramnoza, glukoza, galaktoza, lewuloza, mannoza, laktoza, maltoza, trehaloza, celobioza, dekstryna, skrobia, inulina, erytryt, adonit, dulcyt, sorbit; w mniejszym stopniu nadaje się sacharoza, gdyż rozwój hodowli jest słaby i powolny, prawie żaden po 10 dniach i pozwala jedynie na ograniczony rozwój w ciągu miesiąca.

Sposób wytwarzania antybiotyku 11.837 R.P. polega zasadniczo na hodowaniu *Streptomyces viridans* DS 9466 (NRRL 3087) lub jego mutantów w odpowiednim środowisku odżywczym i warunkach aerobowych i na następnym wyosobnieniu antybiotyku, wytworzonego w czasie tej hodowli.

Szczep *Streptomyces viridans* DS 9466 można hodować stosując każdą metodę hodowli aerobowej, powierzchniowej lub podpowierzchniowej, przy czym ta ostatnia jest korzystniejsza ze względu na wygodę. Do tego celu stosuje się różnego rodzaju aparaturę, używaną powszechnie w przemyśle fermentacyjnym. Można stosować zwłaszcza następujący tok operacji: *Streptomyces viridans* DS 9466 — produkt wyjściowy.

Hodowla na agarze

Hodowla w kolbie wstrząsanej

Hodowla posiewu w zbiorniku fermentacyjnym

Hodowla produkcyjna w zbiorniku fermentacyjnym

Środowisko fermentacyjne powinno zasadniczo zawierać źródło przyswajalnego węgla i azotu, składniki mineralne i ewentualnie czynniki wpływające na wzrost, przy czym wszystkie te składniki można wprowadzać w postaci określonych substancji lub mieszanin złożonych, jakie występują w substancjach biologicznych różnego pochodzenia.

Jako źródło przyswajalnego węgla można stosować węglowodany takie jak glukoza, sacharoza, laktoza, dekstryny, skrobie, melasy lub inne substancje węglowodorowe, jak alkoholo-cukry; np. mannit lub niektóre kwasy organiczne takie, jak kwas mlekowy, cytrynowy, winowy. Niektóre oleje pochodzenia zwierzęcego lub roślinnego, jak olej smalcowy lub olej sojowy mogą z korzyścią zastąpić te różne źródła węglowodorowe lub mogą być też do nich dodane.

Odpowiednie źródła przyswajalnego azotu są bardzo różnorodne. Mogą to być bardzo proste substancje chemiczne jak: azotany, nieorganiczne i organiczne sole amonowe, mocznik, aminokwasy. Można je także wprowadzać poprzez substancje złożone, zawierające głównie azot w postaci proteidów jak: kazeina, albumina, mleko, gluten i ich produkty hydrolizy, mąka sojowa, mąka z orzeszków ziemnych, mączka rybna, ekstrakty mięsne, drożdże, „distillers solubles” (rozpuszczalne pozostałości z destylacji spirytusu zbożowego), namok kukurydziany.

Niektóre spośród dodawanych składników nieorganicznych takie, jak fosforany metali alkalicznych lub metali ziem alkalicznych albo węglany wapnia i magnezu, mogą działać jako mieszaniny buforowe lub neutralizujące.

Inne składniki takie, jak chlorki i siarczany metali alkalicznych i ziem alkalicznych wpływają na ustalenie równowagi jonowej koniecznej dla rozwoju szczepu *Streptomyces viridans* DS 9466 i do wytworzenia antybiotyku. Inne związki nieorganiczne jak sole cynku, kobaltu, żelaza, miedzi i manganu działają zwłaszcza jako aktywatory reakcji przemiany materii szczepu *Streptomyces viridans* DS 9466.

Wartość pH środowiska fermentacyjnego przy rozpoczęciu hodowli winna wynosić 6,0—7,8, ko-

Środowisko hodowlane	Stopień rozwoju	Grzybnia wegetatywna lub grzybnia podstawowa	Wygląd grzybni napowietrznej (obejmujący całość grzybni napowietrznej i sporulacji)	Rozpuszczalny pigment	Obserwacje i właściwości biochemiczne
1	2	3	4	5	6
Agar Ben-nett'a (A)	dobry	grzybnia podstawowa żółto-szarawa, zabarwiająca się na kolor brązowo-zielony w miejscach, gdzie wytwarza się rozpuszczalny pigment zielony	jasno szara do ciemno szarej dobrze rozwinięta	zielony, wskutek starzenia staje się szaro-zielonawy do brązowo-zielonego bardzo ciemnego aż do czarniawego, zależnie od wytworzonej ilości	wytwarzaniu pigmentu rozpuszczalnego zielonego sprzyja obecność ziemi
Agar z mal- zozą i try- ptonem (B)	dobry	grzybnia podstawowa brązowo-żółta, szara- wa	biaława do szarej	szaro-brązowy mało intensywny	
Agar Emerson'a (W-23)	średni	brunatno-żółta jasna dobrze rozwinięta	biaława, ślady	brak	
Agar z glukozą i peptonem (W-7)	średni	jasno-żółta, dosyć do- brze rozwinięta	biaława, bardzo umiarkowany	żółtawy mało inten- sywny	
Agar z pożywką (W-5)	słaby	żółto-szarawa jasna, rozwój umiarkowany	nie ma	brak	
Agar z glukozą i asparaginą (W-2)	średni	żółto żywy do żółto-brązowego	nie ma pod ko- niec dwóch ty- godni, w hodow- lach starszych rozwój umiarko- kowany białawy do szarego	brak w ciągu 2 ty- godni. Po miesiącu szarawy do szaro-zie- lonawego w małej ilo- ści	
Agar z gliceryną i asparaginą (W-3)	umiarkowa- ny	żółto-brunatnawa, z nieregularnym śladem zielonawym	biało-szarawa do jasnego szarawego, rozwój bardzo umiarkowa- wany	szaro-brązowy mało intensywny, przeważnie wytwarzany w małej ilości zielonawy do szaro-zielonego	
Agar z jabłczanem wapniowym Krainsky'ego (C)	dobry	grzybnia podstawowa w kolorze żółto-szarawym, jasna	biała do jasno-szarego	brak lub wytwarzany z opóźnieniem, szarawy mało intensywny	rozpuszczanie jabłczanu wapniowego
Agar z tyrozyną (D)	dobry	grzybnia podstawowa brązowo-żółta	biaława, umiarkowanie rozwinięta	brązowo-żółty	dobrze rozpuszczanie tyrozyny
Agar ze skrobią (W-11)	umiarkowa- ny	grzybnia podstawowa szaro-zielonawa do ciemno-brązowo-zielonej	biaława do szarej, umiarkowanie rozwinięta	zielono-szarawy do szaro-zielonawego	
Agar ze skrobią Pridhama (E)	dobry	grzybnia podstawowa żółto-szarawa, jasna	szara jasna, dosyć dobrze rozwinięta	brak	umiarkowana hydroliza skrobi

1	2	3	4	5	6
Agar syntetyczny Czapka z gliceryną (F)	dobry	grzybnia podstawowa jasna żółto-brązowa jasna do brązowo-żółtej, ciemniejsza w kolorze ciemno-brązowo-zielonym w miejscach wytwarzania się pigmentu zielonego, rozpuszczalnego	biaława do szarej	jasno-żółto-brązowy do brązowo-żółtego, jasnego, po dodaniu ziemi do środowiska wytwarza się zielony rozpuszczalny pigment, który w trakcie starzenia staje się brązowo-szarawy do brązowo-zielonego, bardzo ciemnego prawie czarniawego	obecność ziemi sprzyja wyraźnie wytwarzaniu w tym środowisku pigmentu zielonego, rozpuszczalnego
Hodowla na kartoflu (W-27)	dosyć dobry	grzybnia wegetatywna brązowo-żółto-zielona do zielonej b. ciemnej, w miarę starzenia staje się brązowo-czarniawa	biaława do jasno szarej Rozwój umiarkowany	wytwarzany z opóźnieniem, obfity, zielony, bardzo ciemny przechodzący w czarno-zielonawy, przenika przez cały kartofel	
Żelatyna czysta 12% (G)	średni	hodowla na powierzchni ograniczona do poziomu inokulacji, grzybnia podstawowa żółta	biaława do szarej Rozwój umiarkowany	wytwarzanie opóźnione nie występuje. Brak po 2 tygodniach po miesiącu jasno-żółtawy	Przejście żelatyny w stan ciekły, lecz stosunkowo powolne, w ciągu miesiąca niezupełne
Bulion-pożywka z azotanem (H)	dobry	obróczka biaława na powierzchni	Rozwój bardzo ograniczony, biaława	brak	reakcja azotynowa silnie dodatnia
Bulion z glukozą i azotanem Dimmick'a (i)	umiarkowany	słaba obróczka i zmetnienie bardzo umiarkowane rozpostarte na powierzchni	brak lub biaława, ślady	żółty, bardzo blady	bardzo silnie dodatnia reakcja azotynowa
Syntetyczny bulion Czapka z celulozą (j)	dość dobry	biało-szarawa do żółtawej jasnej	szara, dobrze rozwinięta na całej części papieru wynurzonej z bulionu	brak	reakcja azotynowa silnie dodatnia
Mleko odłuszczone a) o temperaturze 26° (k)	dobry	obróczka dobrze rozwinięta żółtawa, bardzo blada	brak, względnie ślady białawe		W ciągu 2 tygodni wygląd mleka niezmieniony, potem powolna petonizacja, prawie całkowita pod koniec miesiąca rozwoju hodowli, nie ma koagulacji, pH przechodzi od 6,3 do 7,2—7,4 w ciągu miesiąca, w ciągu 2 tygodni wygląd mleka niezmieniony, po upływie 3—4 ty-
b) o temperaturze 37°	dość dobry	obróczka średnio rozwinięta, jasno-żółta do jasnej, brązowo-żółtej	brak, względnie ślady białawe		

1	2	3	4	5	6
					godni hodowli lekka koagulacja z początkiem peptonizacji. pH z 6,3 przechodzi w 5,9—6,1 w cią- gu miesiąca
Środowisko Tresner'a i Dange'a (L)					Nie wytwarza się H ₂ S

rzystnie 6,5—7,5. Optymalną temperaturą dla fermentacji jest 25°—28°C, lecz zadowalający rozwój hodowli produkcyjnej uzyskuje się już w temperaturze 23—35°C. Stopień napowietrzania środowiska fermentacyjnego może się wahać w dość szerokich granicach. Stwierdzono jednak, że szczególnie korzystne jest doprowadzanie powietrza w ilości 0,3—2 litrów na litr bulionu na minutę. Najlepszą wydajność antybiotyku uzyskuje się po 4—7 dniach rozwoju hodowli, przy czym czas ten zależy zasadniczo od zastosowanego środowiska.

Z powyższego wynika, że ogólne warunki hodowli *Streptomyces viridans* DS 9466 dla wytwarzania antybiotyku 11.837 R.P. mogą zmieniać się w dość znacznym stopniu w zależności od potrzeb.

Antybiotyk 11.837 R.P. można wyosobnić z brzeczki fermentacyjnej różnymi sposobami:

Brzeczkę fermentacyjną można przesączyć przy wartości pH = 7 lub wyższej, lecz w tych warunkach znaczna część aktywnej substancji pozostaje w placku filtracyjnym, z którego należy następnie wyekstrahować produkt czynny. Korzystniej jest więc przesączyć brzeczkę przy wartości pH poniżej 5, a najkorzystniej przy wartości pH około 3, bowiem w tych warunkach substancja czynna pozostaje w placku filtracyjnym, skąd można ją wyekstrahować przy wartości pH = 3—7, za pomocą wody, zawierającej alkohol o niskim ciężarze cząsteczkowym, taki jak metanol, etanol lub propanol, albo za pomocą mieszaniny niskocząsteczkowych alkoholi alifatycznych zawierających do 6 atomów węgla, przy czym najodpowiedniejsza mieszanina stanowi normalny butanol + metanol w stosunku objętościowym 2:1 lub 3:1. Można także brzeczkę fermentacyjną przepuścić przez kolumnę, zawierającą żywicę jonitową, typu silnego anionitu, a następnie eluować za pomocą rozpuszczalnika wodnoalkoholowego, takiego jak wodny roztwór metanolu, zawierający elektrolit.

Surowy produkt można wyosobnić z podanych powyżej roztworów alkoholowych lub wodno-alkoholowych przez zagęszczenie roztworu do małej objętości. Zagęszczenia takiego dokonuje się dogodnie w temperaturze poniżej 40°C pod zmniejszonym ciśnieniem. Przez oziębienie i (lub) przez dodanie słabego rozpuszczalnika dla antybiotyku 11.837 R.P., takiego jak: keton, eter, ester, rozpuszczalnik chlorowany, benzen lub heksan, wytrąca się surowy antybiotyk. Jeżeli antybiotyk znajduje się w przesączu brzeczki hodowlanej, to roztwór ten ekstrahuje się rozpuszczalnikiem nie mieszają-

cym się z wodą, takim jak alkohol alifatyczny o 4—5 atomach węgla. Następnie postępuje się jak podano powyżej: zagęszcza się do małej objętości i wytrąca.

Antybiotyk 11.837 R.P. można następnie oczyścić przez związanie go na żywicy jonitowej o charakterze silnego anionitu i następnie wyeluowanie za pomocą roztworu wodnoalkoholowego, zawierającego elektrolit taki jak kwas solny lub chlorek sodowy, amonowy, potasowy, wapniowy lub magnezowy, w ilości 5—50 g na litr eluatu. Następnie eluat zagęszcza się do małej objętości w temperaturze poniżej 40°C pod zmniejszonym ciśnieniem i koncentrat poddaje dializie w przeciwną stronę wody destylowanej przy zastosowaniu przepony z celulozy renerowanej. Sole nieorganiczne i różne zanieczyszczenia przechodzą z wodą, a antybiotyk 11.837 R.P. pozostaje w całości w roztworze po dializie. Roztwór ten zagęszcza się azeotropowo do bardzo małej objętości przez dodanie butanolu pod zmniejszonym ciśnieniem. Antybiotyk oczyszczony wytrąca się z wodnego koncentratu za pomocą mieszaniny rozpuszczalników, takiej jak aceton i izopropanol ewentualnie z dodatkiem eteru lub tlenu izopropylu, w takich ilościach, aby nie nastąpiło wydzielenie się mieszaniny z fazy wodnej, przy czym korzystnymi mieszaninami są aceton-izopropanol (4:1 objętościowo) i aceton-izopropanol-eter (1:1:1 objętościowo).

Można także antybiotyk poddać innemu oczyszczaniu, które polega na zmieszaniu wodnego roztworu antybiotyku 11.837 R.P. z żywicą jonitową o charakterze silnego kationitu aż do osiągnięcia stałej wartości pH w granicach 2—3. Następnie wyciąg przemycia się rozpuszczalnikiem nie mieszającym się z wodą, takim jak alkohol alifatyczny o 4—5 atomach węgla lub ester na przykład octan etylowy, lub mieszaniną tych rozpuszczalników. Korzystnie operację prowadzi się za pomocą mieszaniny równych objętości normalnego butanolu i octanu etylu. Warstwę wodną zagęszcza się do 1/1000, dodaje butanolu i zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem przy ciągłym dodawaniu butanolu. Antybiotyk 11.837 R.P. oczyszczony otrzymuje się przez dodanie słabego rozpuszczalnika antybiotyku, takiego jak heksan, odwirowanie, przemycie i wysuszenie.

Oczywistym jest, że opisane metody można stosować kolejno w dowolnym porządku lub powtarzać kilkakrotnie zależnie od wymagań technolo-

gicznych przy otrzymywaniu antybiotyku 11.837 R.P.

Poniższe przykłady nie ograniczając wynalazku wyjaśniają jak można stosować go w praktyce. W przykładach tych aktywność oznaczono za pomocą testu biologicznego metodą dyfuzji, stosując jako wskaźnik *Bacillus subtilis* i odnosząc rezultaty do wzorca czystego antybiotyku 11.837 R.P. Aktywność ta określana jest w jednostkach (u) na 1 mg w przypadku produktów stałych i w jednostkach (u) na 1 cm³ w przypadku roztworów (jednostka ta określa najmniejszą ilość produktu, który po rozpuszczeniu w 1 cm³ odpowiedniego środowiska hodowlanego, wstrzymuje wzrost *Staphylococcus aureus* 209 P w określonych warunkach).

Przykład I. Do zbiornika fermentacyjnego o pojemności 170 litrów wprowadza się:

namok kukurydziany	4,800 kg
glukozę uwodnioną	2,400 kg
chlorek sodowy	0,600 kg
siarczan magnezowy	0,120 kg
woda do	100 litrów

Po doprowadzeniu pH mieszaniny do wartości 7,15 za pomocą 575 cm³ stężonego roztworu wodorotlenku sodowego (d = 1,33) dodaje się jeszcze 0,600 kg węgla wapniowego.

Następnie środowisko hodowlane sterylizuje się w ciągu 40 minut przez wprowadzenie za pomocą bełkotki pary o temperaturze 122°C. Po oziębieniu objętość bulionu wynosi 120 litrów, a wartość pH = 7,15. Następnie środowisko obsiewa się 200 cm³ kultury szczepu *Streptomyces viridans* DS 9466, znajdującej się we wstrząsanej erlenmeyerce. Hodowla rozwija się w temperaturze 26°C w ciągu 28 godzin przy wstrząsaniu i napowietrzaniu wyjałowionym powietrzem i wówczas nadaje się do obsiewu hodowli produkcyjnej.

Hodowla produkcyjna odbywa się w zbiorniku fermentacyjnym o pojemności 350 litrów, załadowanym następującymi substancjami:

mączka sojowa	8 kg
„Distilles” solubles	1 kg
(rozpuszczalne pozostałości 2 destylacji spirytusu zbożowego)	
skrobia	3 kg
olej sojowy	3 litry
węglan wapniowy	2 kg
chlorek sodowy	2 kg
uwodniony chlorek kobaltawy (6 H ₂ O)	4 g
woda do	180 litrów

Środowisko o wartości pH = 7,05 sterylizuje się w ciągu 40 minut przez doprowadzanie za pomocą bełkotki pary o temperaturze 122°C. Po oziębieniu objętość bulionu wynosi 200 litrów, a wartość pH = 7,15. Wówczas obsiewa się go 20 litrami hodowli poprzedniej ze zbiornika fermentacyjnego 170 litrowego. Hodowla odbywa się w temperaturze 26—27°C w ciągu 138 godzin przy wstrząsaniu i napowietrzaniu powietrzem wyjałowionym. Wartość pH środowiska wynosi wówczas 7,90, a objętość brzeczki 180 litrów. Ilość antybiotyku w tej brzeczce fermentacyjnej wynosi 4515 u/cm³.

Przykład II. Hodowla z posiewu odbywa się w zbiorniku fermentacyjnym 170 litrowym w warunkach podanych w przykładzie I.

Hodowla produkcyjna odbywa się w zbiorniku fermentacyjnym 350 litrowym, zawierającym następujące substancje:

namok kukurydziany	6 kg
skrobia	2 kg
olej sojowy	3 litry
uwodniony chlorek kobaltawy (6 H ₂ O)	4 g
woda do	175 litrów

Po doprowadzeniu pH mieszaniny do wartości 5,90 za pomocą 380 cm³ stężonego roztworu wodorotlenku sodowego (d = 1,33) dodaje się jeszcze 1 kg węgla wapnia.

Mieszaninę sterylizuje się w ciągu 40 minut przez wprowadzanie przy pomocy bełkotki pary o temperaturze 122°C. Po oziębieniu środowisko hodowlane uzupełnia się przez dodanie wyjałowionego roztworu składającego się z:

siarczan amonowy	0,4 kg
wody do	5 litrów

Wtedy objętość bulionu wynosi 200 litrów, a wartość pH = 6,80. Obsiewa się go 20 litrami hodowli ze zbiornika fermentacyjnego 170 litrowego. Hodowla odbywa się w temperaturze 26—27°C w ciągu 144 godzin przy wstrząsaniu i napowietrzaniu wyjałowionym powietrzem. Końcowa wartość pH środowiska wynosi 8,40, a objętość brzeczki fermentacyjnej 185 litrów. Ilość antybiotyku w brzeczce fermentacyjnej wynosi 3550 u/cm³.

Przykład III. 200 litrów brzeczki fermentacyjnej o aktywności 2855 u/cm³ przy wartości pH = 8,4 doprowadza się w kadzi zaopatrzonej w mieszadło do wartości pH = 3 przez dodanie 5 n roztworu kwasu solnego. Następnie dodaje się 12 kg pomocniczego środka filtracyjnego. Mieszaninę przesącza się przez prasę filtracyjną, a placek filtracyjny przemycia 60 litrami wody wodociągowej. Przesącz i wodę z przemycia, praktycznie nieaktywne odrzuca się do ścieków. Z placzka filtracyjnego tworzy się zawiesinę w 150 litrach mieszaniny butanolu (2 objętości) i metanolu (1 objętość) w trakcie mieszania. Wartość pH mieszaniny doprowadza się wówczas do 6 przez dodanie 10 n roztworu wodorotlenku sodowego. Mieszanie kontynuuje się w ciągu 30 minut, po czym papkę przesącza się przez prasę filtracyjną.

Przesącz zachowuje się, a placek filtracyjny przemycia 30 litrami mieszaniny butanolu i metanolu opisanej powyżej. Całość przesącza i cieczy z przemycia (185 litrów) ma aktywność 2075 u/cm³. Placek filtracyjny odrzuca się. Przesącz alkoholowy zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem (20 mm Hg) w temperaturze 35°C do objętości 2 litrów.

Wytrącony w czasie zagęszczania antybiotyki oddziela się przez odsączenie, przemycia acetonem i suszy w suszarce pod próżnią (5 mm Hg). Otrzymuje się 254 g szarozielonego produktu o aktywności 1025 u/mg.

Przykład IV. 375 litrów brzeczki hodowlanej o wartości pH = 7,9 przesiewa się w celu usunięcia największych cząstek. W kadzi w trakcie mieszania doprowadza się wartość pH do 7 za pomocą 5 n kwasu solnego, po czym dodaje 22,5 litrów żywicy Dowex 1 × 2 traktowanej chlorkami. Mieszanie kontynuuje się w ciągu 2 godzin. Następ-

nie mieszaninę przesiewa się przez sito drgające. Żywica pozostaje na sicie, a wyekstrahowaną brzeczkę odrzuca się. Potem żywicę ładuje się do kolumny i przemywa kolejno 50 litrami wodnego 5% roztworu chlorku sodowego, a następnie 10 litrami wody. Przemytą żywicę odwadnia się przez wprowadzenie 20 litrów metanolu. Eluowania dokonuje się za pomocą roztworu metanolowego, zawierającego 20% wody i 2,8% chlorku amonowego. Eluaty zbiera się po 10 litrów. Trzy pierwsze frakcje z eluowania zawierają 98% aktywnego produktu wyeluowanego. Łączy się je i zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem (20 mm Hg) aż do objętości 3 litrów. Roztwór zagęszczony o aktywności 92,950 u/cm³ i gęstości = 1,057 dializuje się w ciągu 48 godzin w przeciwwprądzie wody destylowanej przy zastosowaniu przepony z celofanu. Po tym okresie objętość roztworu wynosi 4,7 litra, a gęstość 1,025. Roztwór zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem (5 mm Hg) do objętości 300 cm³ po czym poddaje liofilizacji. Otrzymuje się 48 g surowego produktu o aktywności 6530 u/mg.

Przykład V. 250 g surowego antybiotyku wytworzonego sposobem według przykładu III rozpuszcza się w 4 litrach wody o wartości pH = 8.

Wodny roztwór przesącza się, po czym przepuszcza przez kolumnę, zawierającą 2,7 litrów żywicy jonitowej Dowex 1 × 2 (w cyklu chlorowym), a odciek odrzuca się. Żywicę przemywa się 2,5 litrami wody, a następnie 2,5 litrami mieszaniny metanolu i wody (80:20 objętościowo). Na koniec antybiotyk eluuje się 10 litrami mieszaniny metanolu i wody (80:20 objętość/objętość), zawierającej 7,5 g/l chlorku potasowego.

Eluat zagęszcza się do 400 cm³ pod zmniejszonym ciśnieniem (20 mm Hg) w temperaturze poniżej 40°C. Koncentrat dializuje się w ciągu 24 godzin w przeciwwprądzie wody destylowanej przy zastosowaniu przepony z regenerowanej celulozy w celu usunięcia soli nieorganicznych oraz różnych zanieczyszczeń organicznych.

Roztwór po dializie, zawierający całą substancję aktywną z eluatu (650 cm³) zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem (20 mm Hg) do objętości 125 cm³.

Do otrzymanego koncentratu dodaje się 20 objętości mieszaniny z eteru, acetonu i izopropanolu (10:10:10 objętościowo), co powoduje wytrącenie się antybiotyku. Po odsączeniu go, przemyciu acetonem i wysuszeniu w ciągu jednej nocy w temperaturze 35°C pod ciśnieniem 2 mm Hg otrzymuje się 8,25 g jasnobrązowego proszku o aktywności 24.600 u/mg.

Przykład VI. 7,9 g proszku otrzymanego w przykładzie V rozpuszcza się w 790 cm³ warstwy cięższej wydzielonej z mieszaniny n — butanolu, octanu etylu i wody (10:10:20 objętościowo) i miesza aż do uzyskania stałej wartości pH = 2,1 z żywicą Amberlite IR 120 (w cyklu kwasowym), dodawaną w małych ilościach (50 cm³ w całości). Żywicę odsącza się, a otrzymany roztwór przemywa dwukrotnie 790 cm³ warstwy lżejszej, wydzielonej z powyżej podanej mieszaniny. Ciecze z przemycia z kolei ekstrahuje się ponownie taką samą objętością warstwy cięższej.

Ciecze warstwy cięższej łączy się, zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem (20 mm Hg) do objętości 15 cm³. Do otrzymanego wodnego koncentratu dodaje się 20 objętości mieszaniny metanolu i eteru. (4:6 objętościowo). Antybiotyk wytrąca się i z pierwszego rzutu uzyskuje się 3,05 g o aktywności 18.300 u/mg.

Przesącz zagęszcza się pod zmniejszonym ciśnieniem (20 mm Hg) do objętości 100 cm³. Następnie dodaje się 320 cm³ metanolu i 35 cm³ normalnego butanolu. Zagęszcza się do objętości 15 cm³ pod zmniejszonym ciśnieniem (20 mm Hg) w temperaturze poniżej 40°C. Po dodaniu 15 objętości n-heksanu, odwirowaniu, przemyciu heksanem i wysuszeniu w ciągu nocy w temperaturze 35°C pod ciśnieniem 2 mm Hg, otrzymuje się 1,78 g oczyszczonego antybiotyku o aktywności 36,000 u/mg.

Ciecze warstw lżejszych łączy się i zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem (20 mm Hg) do objętości około 70 cm³. Przez dodanie 15 objętości heksanu wydziela się 1,5 g brązowego proszku o aktywności 17.200 u/mg.

Przykład VII. 542 mg antybiotyku wytworzonego w przykładzie VI o aktywności 36.000 u/mg rozpuszcza się w 20 cm³ wody. Wartość pH, która po tym rozpuszczeniu wynosi 2,3 doprowadza się do 6,85 za pomocą 8,9 cm³ 0,1 n Na OH i obojętny roztwór liofilizuje. Otrzymuje się 565 mg soli sodowej antybiotyku, której roztwór wodny wykazuje maksimum absorpcji w ultrafiolecie przy 256,5 mμ E 1% 1 cm = 106. Jej skład elementarny jest następujący:
C = 47,4% H = 7,07% O = 35,3% (z różnicy) N = 5,01% P = 1,84% Na = 3,4%.

Przykład VIII. 50 g antybiotyku, wytworzonego sposobem według przykładu V rozpuszcza się w 500 cm³ wody destylowanej. Roztwór dializuje się w ciągu nocy za pomocą 40 litrów wody destylowanej przy zastosowaniu przepony z celulozy regenerowanej.

Po dializie do roztworu antybiotyku dodaje się 1 objętość n-propanolu i mieszaninę wprowadza do górnej części kolumny, załadowanej w kierunku od dołu do góry węglem granulowanym, uprzednio przemytym rozcieńczonym kwasem solnym, 75 g, żywicą Amberlite IR 120 (cykl H) 125 cm³, węglem granulowanym tego samego rodzaju co powyżej w ilości 500 g.

Po przepuszczeniu roztworu antybiotyku przez kolumnę, przeprowadza się eluowanie za pomocą mieszaniny n-propanolu i wody (50:50 objętościowo). Frakcje zawierające substancję aktywną (7 litrów) łączy się, zobojętnia do wartości pH = 7 za pomocą 1 normalnego roztworu wodorotlenku sodu i zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze poniżej 40°C do objętości 140 cm³.

Koncentrat dializuje się w ciągu 24 godzin w przeciwwprądzie czterokrotnie po 10 litrów wody destylowanej, a następnie z dodatkiem 1 objętości n-propanolu.

Następnie wytrąca się antybiotyk przez dodanie 10 objętości acetonu. Po jego oddzieleniu i wysuszeniu otrzymuje się 23,5 g antybiotyku w postaci soli sodowej o aktywności 42.400 u/mg.

Przykład IX. 22 g antybiotyku wytworzonego według przykładu VIII rozpuszcza się w 110 cm³ wody, po czym do roztworu dodaje 110 cm³ n-propanolu i mieszaninę przepuszcza przez kolumnę zawierającą 100 cm³ tlenku glinowego uprzednio przemytego o wartości pH = 4. Eluowanie przeprowadza się za pomocą mieszaniny n-propanolu z wodą (50 : 50 objętościowo). Frakcje, zawierające substancję aktywną, łączy się (430 cm³), zagęszcza pod zmniejszonym ciśnieniem w temperaturze poniżej 40°C do objętości 100 cm³, koncentrat dializuje w ciągu nocy w przeciwnym kierunku 10 litrów wody destylowanej. Do dializatu dodaje się 1 objętość n-propanolu i wytrąca aktywną zasadę 10 objętościami acetonu. Otrzymuje się 12 g oczyszczonego antybiotyku w postaci soli sodowej o aktywności 44.000 u/mg, którego dane charakterystyczne są następujące:

C = 45,0% H = 7,4% O = 37,6% (z różnicy) N = 3,72%
P = 2,16% Na = 4,15%.

$$(\alpha) \frac{22}{D} = +6^{\circ} \pm 1 \quad (C = 0,6\% - \text{woda})$$

5 Widmo w ultrafiolecie: koniec absorpcji: mμ E ^{1%}
1 cm
220 30
257 3,5

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania nowego antybiotyku 11.837 R. P. **znamienny tym**, że szczep *Streptomyces viridans* DS 9466 (NRRL 3087), hoduje się w środowisku odżywczym i w warunkach aerobowych, po czym wytworzony w toku tej hodowli antybiotyk wyosabia się za pomocą klasycznych metod ekstrakcji i oczyszczania.

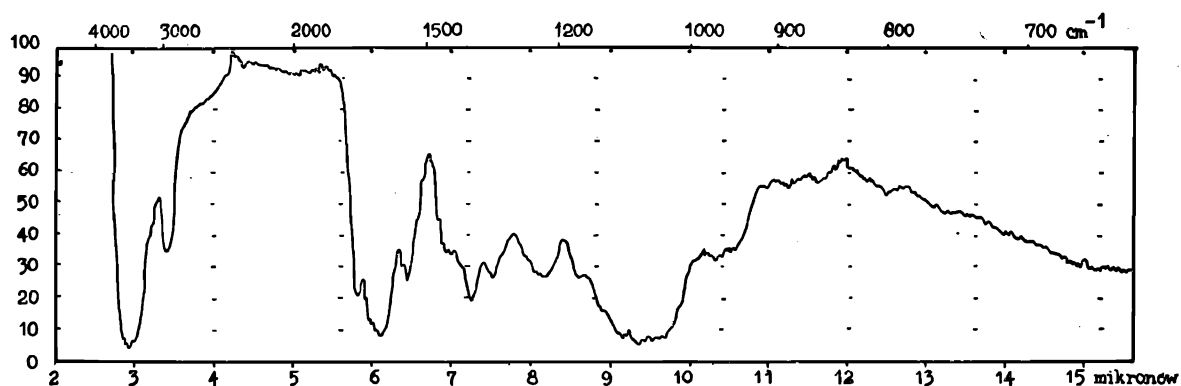


Fig. 1

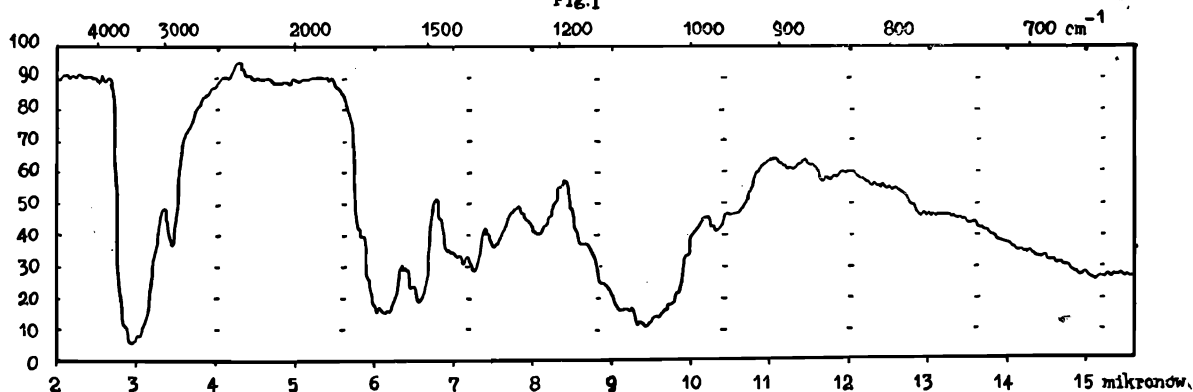


Fig. 2