

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 82 07 20 (P. 237567)

Pierwszeństwo: 81 07 20 Stany Zjednoczone
Ameryki

Zgłoszenie ogłoszono: 83 03 14

Opis patentowy opublikowano: 1987 01 31

Int. Cl.⁸

C12P 17/16//
C12R 1/465
C07D 315/00
A61K 31/335

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Pfizer Inc., Nowy Jork
(Stany Zjednoczone Ameryki)

Sposób wytwarzania nowego, kwasowego, policyklicznego antybiotyku eterowego

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania nowego kwasowego policyklicznego antybiotyku eterowego charakteryzowanego biologicznie poprzez oddziaływanie na transport kationów w mitochondriach.

Rodzina antybiotyków, do której należy antybiotyk wytwarzany sposobem według wynalazku obejmuje monesyne (J. Amer. Chem. Soc., 89-5737, (1967)); nigerycyne (Biochem. Biophys. Res. Comm., 33:29, (1968)); grizoriksyne (J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1421, (1970)); dianemycyne (J. Antibiotics 22:161, (1969)); salinomycyne (J. Antibiotics, 27:814 (1974)); X-537A (J. Chem. Soc. Chem. Commun., 967, (1972)); X-206 (J. Chem. Soc. Chem. Commun., 927, (1971)); A204A (J. Amer. Chem. Soc., 95:3399, (1973)); mutalomycyne (J. Antibiotics, 30:903 (1977)); ionomycyne (J. Amer. Chem. Soc., 101:3344, (1979)); K-41B (J. Antibiotics, 32:169, (1979)); A-130B i A-130C (J. Antibiotics, 33:94, (1980)); leuseramycyne (J. Antibiotics, 33:137, (1980)); oraz A-28695 B (J. Antibiotics, 33:252 (1980)). Przedmiot ten był omawiany również przez Westley'a, „Polyether Antibiotics”, Adv. Appl. Microbiol. 22:177 (1977).

Wyżej zestawione policykliczne antybiotyki eterowe są aktywne wobec bakterii Gram-dodatnich grzybów i pierwotniaków. Antybiotyki te wykazują wysoką czynność antykokcydialną.

Dobrze znana choroba pierwotniakowa, kokcydioza, pozostaje poważnym problemem, a jej zwalczanie ma znaczenie ekonomiczne w praktykach we-

2

teryaryjnych, zwłaszcza w przemyśle drobiarskim, Kokcydioza następuje w wyniku zakażenia jednym lub kilkoma gatunkami *Eimeria* lub *Isospora* (dla podsumowania patrz Lund i Farr w „Diseases of Poultry”, wydanie piąte, Biester and Schwarte, wyd., Iowa State University Press, Ames, Ia., 1965, strony 1056—1096). Istnieje sześć gatunków kokcydia, które powodują łatwo zauważalną zachorowalność u wrażliwych kurcząt. *Eimeria tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. acervulina*, *E. maxima* i *E. mivati* powodują szkody, bądź to bezpośrednio, przez zniszczenie komórek nabłonkowych przewodu pokarmowego lub pośrednio, przez produkcję toksyn. Trzy inne gatunki należące do tego samego rodzaju uważa się za stosunkowo nieszkodliwe; jednakże *E. mitis*, *E. hageni* i *E. praecox* mogą zmniejszać przyrost wagi, obniżyć wydajność żywienia i ujemnie wpływać na produkcję jaj. W świetle dużych strat ekonomicznych i wad pewnych znanych czynników przeciwkokcydialnych, prowadzi się badania zmierzające do znalezienia lepszych czynników przeciwkokcydialnych.

Zapalenie jelit jest inną chorobą, która może powodować poważne straty ekonomiczne producentów inwentarza żywego. Zapalenie jelit występuje u kurcząt, świń, bydła i owiec i jest powodowane głównie przez bakterie beztlenowe, zwłaszcza *Clostridium perfringens* i wirusy. Enterotoksemia u zwierząt przeżuwających, której przejawem jest np. „choroba przejeżdżania” u owiec, jest stanem po-

wodowanym przez zakażenie *C. perfringens*.

Dyżenterya świń jest jedną z najczęściej spotykanych chorób świń diagnozowanych w Stanach Zjednoczonych. Choroba ta występuje w wielu innych krajach i rocznie powoduje straty wielu tysięcy dolarów u hodowców świń na całym świecie. Ostatnio odkryto, że organizmem wywołującym chorobę jest duży krętek. Organizm ten, *Treponema hyodysenteriae*, został obecnie wyizolowany i wykazano, że może on powodować tę chorobę (Harris D.L. i inni: Swine Dysentery—1 Inoculation of Pigs with *Treponema hyodysenteriae* (New Species) and Reproduction on the Disease", *Vet. Med./SAC*, 67:61-64: 1972). Dalej podane dane dotyczą prób prowadzonych z tym organizmem. Należy zauważyć, że nie wiadomo, czy *T. hyodysenteriae* jest jedynym organizmem powodującym dyżenteryę świń. Jednakże z dostępnych danych można wnioskować, że jest on głównym źródłem zakażenia.

Zwiększenie wydajności (zwiększenie szybkości wzrostu i/lub zwiększenie wydajności utylizacji pożywienia) u zwierząt przeżuwających, takich jak bydło, jest innym ekonomicznie pożądanym przedmiotem wiedzy weterynaryjnej. Szczególnie interesująca jest promocja wzrostu uzyskiwana przez zwiększenie wydajności utylizacji pożywienia. Mechanizm utylizacji zasadniczej odżywczej porcji (węglowodanów) pożywienia zwierząt przeżuwających jest dobrze znany. Mikroorganizmy w pierwszym żołądiku zwierzęcia rozkładają węglowodany z wytworzeniem monosacharydów, a następnie przetwarzają te monosacharydy na związki pirogronianowe. Pirogroniany są metabolizowane w procesach mikrobiologicznych z wytworzeniem octanów, maślanów lub propionianów, znanych łącznie jako lotne kwasy tłuszczowe (VFA). Dla bardziej szczegółowego omówienia patrz Leng w „Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant”, Philipson i inni, wyd., Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne, England, 1970, strony 408—410.

Względna sprawność utylizacji VFA omawia McCullough w „Feedstuffs”, czerwiec 19, 1971, strona 19; Eskeland i inni w *J. An. Sci.* 33, 282 (1971); oraz Church i inni w „Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants”, Vol. 2, 1971, strony 622 i 625. Choć octany i maślany są utylizowane, propioniany są utylizowane z większą sprawnością. Ponadto, gdy dostępnych jest za mało propionianów, u zwierząt może rozwinąć się ketoza. Tak więc korzystny związek stymuluje zwierzęta do produkcji z węglowodanów wyższego udziału propionianów, przez co zwiększa się utylizacja węglowodanów a zmniejsza występowanie ketozy.

Inną chorobą powodującą straty ekonomiczne u producentów żywności jest powodowana przez pasożyty pierwotniakowe rodzaju *Theileria*. Choroba ta, theileriosis, jest również znana jako „East Coast Fever”, „Coastal fever” lub Rhodesian tick fever”. Pasożyt *Theileria* atakuje czerwone ciała krwi lecz ich nie niszczy, co powoduje ostre lub chroniczne zakażenia gorączkowe. U bydła choroba ta charakteryzuje się wysoką gorączką, obrzękiem węzłów chłonnych, wyciefczeniem i wysoką śmiertelnością. Choroba ta jest bardzo poważnym problemem we Wschodniej i Centralnej Afryce. Dla bardziej szcze-

gółowego omówienia theileriosis patrz „The Merck Veterinary Manual”, Siegmund i inni, Eds., Merck Co., Rahway, N.J., 5th Ed., strony 431—433 (1979).

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania nowego, kwasowego, policyklicznego antybiotyku eterowego o wzorze podanym na załączonym rysunku, polegającego na tym, że w podpowierzchniowej hodowli aerobowej w wodnej pożywie prowadzi się hodowlę *Streptomyces halstedii* ATCC 31812, izolowanego z próbki gleby w Japonii.

Antybiotyk wytwarzany sposobem według wynalazku, o wzorze podanym na załączonym rysunku i jego kationowe sole są aktywne wobec różnych mikroorganizmów i są efektywne w zwalczaniu kokcydiozy, zapalenia jelit, dyżenteryi świń i theileriosis jak również w promowaniu wzrostu drobiu i zwierząt przeżuwających. Na rysunkach figura 1 i figura 2 przedstawiono następujące widma absorpcji w podczerwieni:

fig. 1 — Antybiotyk 53 607 w postaci soli sodowej; fig. 2 — Antybiotyk 53 607 w postaci wolnego kwasu.

Mikroorganizm wytwarzający antybiotyk według niniejszego wynalazku został wyizolowany z próbki gleby pobranej w Hiroshimie, Japonia. Badania wykazały, że mikroorganizm ma morfologiczne właściwości *Streptomyces*. Stwierdzono również, że ma on wąskie strzępki Actinomycetales i grzybnie powietrzną z łańcuchami zarodników charakterystyczną dla rodzaju *Streptomyces*. Identyfikacja rodzajowa została dalej potwierdzona analizą ścian komórkowej.

Hodowlę mikroorganizmu inokulowano ze skosu do ciekłej pożywki ATCC#172 i prowadzono hodowlę w ciągu 4 dni w temperaturze 28°C, na wstrząsarce. Następnie usunięto ją ze wstrząsarki, odwirowano, przemyto trzykrotnie sterylną wodą destylowaną i posiano na pożywkach zwykle stosowanych do identyfikacji członów Actinomycetales.

Inkubację prowadzono w temperaturze 28°C, jeżeli nie zaznaczono inaczej, a wyniki rejestrowano w odpowiednim czasie; podane tu wyniki otrzymano po 2 tygodniach, jeżeli nie zaznaczono inaczej. Pożywki identyfikacyjne stosowane do charakteryzowania hodowli i odnośniki do ich składu są następujące:

1. Bullion z tryptonem i ekstraktem z drożdży (ISP#1, Difco)
2. Agar z ekstraktem z drożdży i z ekstraktem siodowym (ISP#2, Difco)
3. Agar z mąką owsianą — (ISP#3, Difco)
4. Agar z nieorganicznymi solami i skrobią — (ISP#4, Difco)
5. Agar z gliceryną i asparaginą (ISP#5, Difco)
6. Agar z peptonem, ekstraktem z drożdży i żelazem (ISP#6, Difco).
7. Agar Czapeka z sacharozą — S.A. Walksman, „The Actinomycetes”, Vol. 2, pożywka no. 1, strona 328, 1961
8. Agar z glukozą i asparaginą — tamże, pożywka no. 2, strona 328
9. Agar Bennetta — tamże, pożywka no. 30, strona 331
10. Pożywka Emersona, tamże, pożywka no. 28, strona 331

11. Agar odżywczy — tamże, pożywka no. 14, strona 330
12. Agar tyrozynowy Gordona i Smitha — R.E. Gordon i M.M. Smith, Jr. *Bact.* 69: 147—150, 1955
13. Agar kazeinowy — tamże
14. Agar z jablczanem wapnia — S.A. Waksman, *Bact. Rev.* 21: 1—29, 1957
15. Żelatyna — R. E. Gordon i J.M. Mihm, Jr. *Bact.* 73: 15—27, 1957
16. Skrobia — tamże
17. Bulion z organicznymi azotanami — tamże
18. Bulion z dekstrozą i azotanami — S.A. Waksman, *The Actinomycetes*, Vol. 2, pożywka no. 1, strona 328, 1961; 30 g sacharozy zastąpiono 3 g dekstrozy, pominięto agar
19. Agar z ziemniakiem i marchewką — M.P. Lechevalier, Jr. *Lab. and Clin. Med.* 71: 934—944, 1968 lecz z użyciem jedynie 30 g ziemniaka, 2,5 g marchwi i 20 g agaru
- 20 2% agar na wodzie wodociągowej
21. Odtłuszczone mleko — Difco
22. Utylizacja celulozy —
 - a) H.L. Jensen, *Proc. Linn. Soc. N.S.W.* 55: 231—248, 1930
 - b) M. Levine i H.W. Schoenlein, „A Compilation of Culture Media”, pożywka no. 2511, 1930
23. Węglowodany — ISO#9, Difco; Nonomura i Ohara, pożywka C-2; Nonomura, H. i Y. Ohara, *Z. Ferment. Technol.* 49: 887—894, 1971.
24. Zakres temperatury — pożywka ATCC 172 w „ATCC Culture Collection Catalogue”, wydanie 14, strona 518, 1980.

Nową kulturę (Pfizer N 393-39) opisano jak następuje na różnych pożywkach z barwami opisanymi w zwykłej terminologii, lecz dokładne barwy (numery podano w nawiasie) oznaczono przez porównanie z wzorcami barwnymi z *Color Harmony Manual*, wydanie czwarte:

Agar z ekstraktem z drożdży i z ekstraktem słodowym — wzrost dobry, kremowy do jasnożółtawego (bliski 2 ca), umiarkowanie wzniesiony, gładki, szorstki do zmarszczonego, brak grzybni powietrznej; spód taki sam jak powierzchnia; brak rozpuszczalnego pigmentu.

Agar z mąką owsianą — wzrost umiarkowany, szary do brązowawoszarego (2 ge, 1 lg do 2 ni), cienki do lekko wzniesionego, gładki z małymi białymi kropkami; rzadka grzybnia powietrzna, biała do jasnoszarawej; spód taki sam jak powierzchnia; rozpuszczalny pigment jasnożółtawy.

Agar z nieorganicznymi solami i skrobią — wzrost umiarkowany, żółtawobrazowy do brązowego (2 ic, 3 ne do 3 le), cienki, gładki, brak grzybni powietrznej, spód taki sam jak powierzchnia, brak rozpuszczalnego pigmentu.

Agar z gliceryną i asparaginą — wzrost słaby do umiarkowanego, mętnobiały, gładki z kilkoma małymi białymi punktami, rzadka grzybnia powietrzna, biała; spód taki sam jak powierzchnia; brak rozpuszczalnego pigmentu.

Agar tyrozynowy Gordona i Smitha — wzrost słaby do umiarkowanego, bezbarwny do kremowego (2 ca), cienki, gładki, brak grzybni powietrznej; spód taki sam jak powierzchnia; brak rozpuszczalnego pigmentu.

Agar Czapeka z sacharozą — wzrost słaby, bezbarwny do mętno-białego, cienki, gładki z kilkoma małymi białymi punktami grzybni powietrznej; spód taki sam jak powierzchnia; brak rozpuszczalnego pigmentu.

Agar z glukozą i asparaginą — wzrost umiarkowany, żółtawoszary do lawendowoszarego (2 ig, 3 ge do 3 ig), cienki, gładki lecz słabo zmarszczony w pobliżu krawędzi; grzybnia powietrzna jasnoszarawa (2 ge); spód taki sam jak powierzchnia; rozpuszczalny pigment jasnożółtawy.

Agar glukozowo-asparaginowy — wzrost umiarkowany, żółtawoszary do lawendowoszarego (2 ig, 3 ge do 3 ig), cienki, gładki lecz lekko zmarszczony w pobliżu krawędzi; grzybnia powietrzna szarawa (2 ge); spód taki sam jak powierzchnia; rozpuszczalny pigment jasnożółtawy.

Agar z jablczanem wapnia — wzrost słaby, bezbarwny z mętno-białym marginesem, podpowierzchniowy, gładki z małymi punktami szarawej (seria bliskiej szarości 2 dc do 2 fe) grzybni powietrznej; spód taki sam jak powierzchnia; brak rozpuszczalnego pigmentu.

Agar kazeinowy — wzrost umiarkowany, jasnobrazowawy (2 ne do 3 ne), cienki, gładki do lekko szorstkiego, brak grzybni powietrznej; spód taki sam jak powierzchnia; brak rozpuszczalnego pigmentu.

Agar Bennetta — wzrost dobry, brązowy (3 ng do 3 ni), wzniesiony, zmarszczony, brak grzybni powietrznej; spód taki sam jak powierzchnia; rozpuszczalny pigment jasnożółtawy (2 ca).

Agar Emersona — wzrost umiarkowany do dobrego; jasnożółtawobrazowy (2 ca do 3 ca) do zielonawoszarego (23 ge do 23 ig), cienki do wzniesionego, gładki do lekko szorstkiego lub występujący w postaci przeponowych kubków, które są nieregularnie zmarszczone, brak grzybni powietrznej; spód taki sam jak powierzchnia; brak rozpuszczalnego pigmentu.

Agar odżywczy — wzrost słaby do umiarkowanego, jasnożółtawy (2 ca), cienki, gładki, brak grzybni powietrznej; spód taki sam jak powierzchnia; brak rozpuszczalnego pigmentu.

Agar żelatynowy — wzrost umiarkowany, jasnożółtawy (2 ca), cienki, gładki, brak grzybni powietrznej; spód taki sam jak powierzchnia; brak rozpuszczalnego pigmentu.

Agar skrobiowy — wzrost dobry, kremowy, jasnożółtawy do jasnożółtawobrazowego (2 ca do blisko 3 gc), cienki do lekko wzniesionego, gładki lecz zmarszczony ku krawędzi, brak grzybni powietrznej; spód taki sam jak powierzchnia; brak rozpuszczalnego pigmentu.

Agar z ziemniakiem i marchwią — wzrost umiarkowany, kremowy (2 ca) z szarawym do ciemnoszarego marginesem (seria bliskiej szarości 2 fe, 2 ih do 2 ml), cienki, gładka grzybnia powietrzna szara do ciemnoszarej; spód taki sam jak powierzchnia; brak rozpuszczalnego pigmentu.

Agar na wodzie wodociągowej — wzrost słaby, bezbarwny do mętno-białego, cienki, gładki, z kilkoma małymi białymi punktami grzybni powietrznej; spód taki sam jak powierzchnia, brak rozpuszczalnego pigmentu.

Uwagi o biochemicznych właściwościach są zsumowane jak następuje:

1. Melanina nie wytwarzana
2. Siarkowodor nie wytwarzany
3. Żelatyna upłynniana
4. Skrobia hydrolizowana
5. Azotany redukowane do azotynów
6. Słaby wzrost na celulozie Jensena
7. Brak wzrostu na celulozie Levine'a i Schoe-
leina
8. Brak rozkładu na obu pożywkach celulozowych
9. Brak koagulacji na mleku
10. Brak peptonizacji na mleku
11. Brak rozkładu kazeiny, jabczanu wapnia i
tyrozyny

12. Utylizacja węglowodanów:

- I. Na pożywce Nonomury glukoza, arabinoza i ksyloza utylizowane; rafinoza wątpliwie utylizowana; sacharoza, inozyt, mannit, fruktoza i ramnoza nie utylizowane.

- II. Na pożywce ISP#9 glukoza, arabinoza, ksyloza i sacharoza utylizowane; fruktoza, inozyt, mannit, rafinoza i ramnoza nie utylizowane.

Na agarze z ziemniakami i marchwią po 15 dniach inkubacji poczyniono następujące obserwacje morfologiczne:

Masa zarodników w serii barwy szarej; łańcuchy zarodników proste, skręcone, nieregularnie kręte lub faliste, rzadko haczykowane, 10 do 30 zarodników w łańcuchu, rzadko mniej niż 10 zarodników w łańcuchu; zarodniki owalne, eliptyczne do pałeczkowatych, $1-1,8 \times 0,8-0,9 \mu\text{m}$, gładkie, co wynika z przemiatającej spektroskopii elektro-
nowej.

Stosunek temperatury do szybkości wzrostu obserwowano jak następuje:

Temperatura	Wzrost
21°C	dobry do doskonałego
28°C	dobry
37°C	umiarkowany
45°C	słaby

Jak wyżej zauważono, analiza ściany komórkowej potwierdziła identyfikację rodzajową hodowli jako gatunku *Streptomyces*. Analiza całej komórki wykazała obecność kwasu LL-dwuaminopimelinowego i glicyny i brak diagnostycznych cukrów. Metody stosowane do analiz aminokwasów całej komórki i cukru są opisane w Becker, B i inni, *Appl. Microbiol.*, 12: 421-423, 1964; oraz Lechevalier, M. P., *J. Lab. Clin. Med.*, 71: 934-944, 1968.

Kultura N 393-39 charakteryzuje się jasnoszarą do szarej barwy zarodników w masie, prostymi do krętych łańcuchami zarodników, gładkimi zarodnikami i niezdolnością do wytwarzania melaniny. Obecność kwasu LL-dwuaminopimelinowego i nieobecność cukrów diagnostycznych w hydrolizacie całej komórki ustalają przypisanie jej do rodzaju *Streptomyces*. Hodowla blisko przypomina *Streptomyces halstedii* opisany w Shirling, E.B. i Gottlieb, D, 1968, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 18:69-189, tak więc do porównania użyto typowego szczepu

S. halstedii ATCC 10897. Obie kultury zgadzają się ze sobą w następujących właściwościach: morfologii łańcuchów zarodników, morfologii powierzchni zarodników, ujemną produkcją melaniny i większością właściwości biochemicznych. Kultura N 393-39 różni się od *S. halstedii* nieobecnością grzybni powietrznej w wielu pożywkach; brązowej zamiast szarawej do czarnej barwy spodu kolonii na ISP#2, ISP#3 i ISP#4; ujemną produkcją H_2S i niezdolnością do utylizacji fruktozy. Ponieważ różnice te są jedynie małymi wariacjami pomiędzy szczepami *Streptomyces*, N 393-39 przyjmuje się za nowy szczep *Streptomyces halstedii* (Waksman i Curtis) Waksman i Henrici.

Nową kulturę (Pfizer N 393-39) przekazano 23 lutego 1981 do American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, nadając jej oznaczenie *Streptomyces halstedii* ATCC 31812. Zapewniono trwałość depozytu tej kultury w The American Type Culture Collection w Rockville, Maryland i łatwość dostępu publicznego w trakcie efektywnej ważności patentu, w przypadku gdy patent zostanie udzielony. Dostęp do kultury w trakcie przebiegu zgłoszenia jest zapewniony pod symbolem 37 CFR 1.14 i 35 USC 112. Wszystkie ograniczenia dostępu do kultury zdeponowanej będą nieodwołalnie zniesione po udzieleniu patentu.

Hodowlę kultury *Streptomyces halstedii* ATCC 31812 można prowadzić w warunkach podobnych do stosowanych w poprzednich fermentacjach dających antybiotyki polieterowe. Patrz np. opis patentowy Stanów Zjednoczonych nr 4195 079. Hodowla korzystnie ma miejsce w wodnych pożywkach w podpowierzchniowych, aerobowych warunkach, przy mieszaniu w temperaturze 24 do 36°C. Pożywki użyteczne w hodowli obejmują źródła przyswajalnego węgla, jak cukry, skrobie i gliceryna; źródło organicznego azotu, jak kazeina, enzymatyczne hydrolizaty kazeiny, mąka sojowa, mąka z nasienia bawełny, mąka arachidowa, gluten pszeniczny, mączka mięsna i mączka rybna. Z korzystnymi wynikami można stosować również substancje wzrostowe, takie jak ekstrakt z ziarna i ekstrakt z drożdży oraz sole, jak chlorek sodu i węglan wapnia oraz pierwiastki śladowe, jak żelazo, magnez, cynk, kobalt i mangan. Jeżeli w trakcie fermentacji zachodzi nadmierne pienienie, to do pożywki fermentacyjnej można dodać czynników przeciwpiennych, takich jak oleje roślinne lub silykony. Napowietrzanie pożywki w zbiornikach dla hodowli podpowierzchniowej korzystnie utrzymuje się na poziomie około 1/2 do 2 objętości sterylne-
go, wolnego powietrza na objętość brzezki fermentacyjnej na minutę, wprowadzanego do brzezki przez belkotkę. Mieszanie można utrzymywać za pomocą mieszadeł, zwykle znanych fachowcom w dziedzinie fermentacji. Szybkość mieszania zależy od typu użytego mieszadła. Wstrząsanie w kolbach prowadzi się zwykle z szybkością 150 do 200 cykli na minutę, natomiast fermentor zwykle prowadzi się przy 300 do 600 obrotach na minutę. W trakcie przenoszenia organizmu i jego wzrostu muszą być oczywiście utrzymane warunki jałowe.

Inokulum do wytwarzania antybiotyku o podanym wzorze, sposobem według wynalazku można

otrzymać stosując wzrost ze skosu hodowli. Wzrost może być użyty do inokulowania bądź to kolb wstrząsanych bądź też zbiorników inokulum bądź też zbiorniki inokulum mogą być posiewane z kolb. Wzrost we wstrząsanych kolbach zwykle osiąga maksimum w ciągu 2 do 4 dni, natomiast dla inokulum w podpowierzchniowych warunkach hodowli w tanku najkorzystniejszym okresem będzie zwykle 1 1/2 do 3 dni.

Postęp produkcji antybiotyku w trakcie fermentacji i bioaktywność brzezki fermentacyjnej można śledzić badaniem biologicznym brzezki przy użyciu wrażliwego szczepu *Staphylococcus aureus* lub *Bacillus subtilis*. *S. aureus* ATCC 6538 i *B. subtilis* ATCC 6633 są szczepami odpowiednimi do tego celu. Stosuje się standardową technikę oznaczania na płytkach, przyjmując jako miarę aktywności antybiotycznej strefę hamowania otaczającą krążek z bibuły filtracyjnej. Użytecznym narzędziem do analizy antybiotyku produkowanego w pożywce fermentacyjnej i składu surowych i oczyszczonych materiałów ekstrahowanych z brzezki fermentacyjnej jest także chromatografia cienkowarstwowa na żelu krzemionkowym. Chromatogramy na żelu krzemionkowym Analtech GF rozwija się w układzie octan etylu/metanol (9:1) lub chloroform/metanol (9:1). Antybiotyczny związek uwidacznia się przez spryskanie waniliną w etanolem kwasie siarkowym (3 g waniliny w 97 ml etanolu i 3 ml stężonego kwasu siarkowego) i ogrzewając płytę TLC w 80°C. Antybiotyk ukazuje się w postaci różowej plamy. Można również nałożyć na płytę agar posiany *S. aureus* lub *B. subtilis* i inkubować w 37°C w ciągu 16 godzin, dla ujawnienia antybiotyku.

Antybiotyk wytwarzany przez fermentację *S. halstedii* ATCC 31812 można wydzielić i odzyskać przez ekstrakcję całej, nie sączonej brzezki fermentacyjnej za pomocą organicznego rozpuszczalnika, jak chloroform, octan etylu, keton metyloizobutyłowy lub butanol, w naturalnym pH. Ekstrakt rozpuszczalnikiem można następnie odparować w próżni do rzadkiego syropu.

Typowa metoda wydzielenia i odzyskiwania antybiotyku według wynalazku (dalej „Antybiotyczny związek 53 607”) jest następująca: Całą brzezkę z fermentacji *S. halstedii* ATCC 31812 ekstrahowano ketonem metyloizobutyłowym. Z ekstraktu rozpuszczalnikiem otrzymano, po odparowaniu rozpuszczalnika w próżni, ciemny olej. Olej rozpuszczono w chloroformie i wylano na złoże żelu krzemionkowego. Złoże żelu krzemionkowego przemyto następnie kolejno chloroformem, octanem etylu i acetonem. Frakcje płuczne badano chromatografią cienkowarstwową, stwierdzając, że związek antybiotyczny 53 607 znajduje się prawie wyłącznie we frakcji octanu etylu. Frakcję octanu etylu odparowano do sucha, a pozostałe frakcje odrzucono. Suche frakcje octanu etylu oczyszczono dalej chromatografią kolumnową, przez rozpuszczenie w octanie etylu i podanie na kolumnę upakowaną żelem krzemionkowym zawieszonym w octanie etylu i elucję octanem etylu. Wycinki kolumny zawierające związek antybiotyczny 53 607 (oznaczony chromatografią cienkowarstwową) połączono i przez

odparowanie zmniejszono objętość. Materiał ten poddano chromatografii na kolumnie upakowanej nośnikiem Sephadex LH-20 w metanolu, a frakcje zawierające związek antybiotyczny 53 607 połączono, odparowano do zmniejszonej objętości i rozpuszczono w chloroformie. Chloroformowy roztwór przemyto 5% buforem fosforanu jednosodowego doprowadzonym do pH 4,5 za pomocą kwasu fosforowego.

Następną fazę rozpuszczalnika przemyto buforem fosforanu dwusodowego 5% wagowo-objętościowych, który za pomocą roztworu wodorotlenku sodu doprowadzono do pH 9,0. Fazę rozpuszczalnika wysuszono nad bezwodnym siarczanem sodu i odparowano. Pozostałość rozpuszczono w acetonie i umieszczono w lodówce, co spowodowało wytrącenie związku antybiotycznego 53 607 w postaci soli sodowej. Wolny kwas można otrzymać przez przemycie roztworu soli sodowej w octanie sodu wodą doprowadzoną do pH 4,5. Odparowanie rozpuszczalnika dało kryształy wolnego kwasu związku antybiotycznego 53 607.

Analiza związku antybiotycznego 53 607 wykazuje, że strukturę tego związku określa wzór podany na załączonym rysunku.

Związek antybiotyczny 53 607 wykazuje czynność inhibowania wobec wzrostu szeregu mikroorganizmów Gram — dodatnich. W tabeli I poniżej zestawiono wyniki prób MIC *in vitro*. Dla tej próby, każdy organizm jest inokulowany w serii próbek testowych zawierających pożywkę i różne stężenie związku 53 607, w celu określenia minimalnego stężenia antybiotyku w mcg/ml, które hamuje wzrost organizmu w czasie 24 godzin (MIC).

W stosunku do bakterii gram-ujemnych, takich jak *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* i *Enterobacteriaceae aerogenes*, wartości MIC w każdym przypadku wyniosły > 50.

Związek antybiotyczny 53 607 i jego kationowe sole wykazują znakomitą aktywność wobec zakażeń kokcydialnych u drobiu. Wprowadzone do diety kurcząt na poziomie 50 do 200 ppm, związki te są efektywne w zwalczaniu zakażeń spowodowanych *Eimeria tenella*, *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. brunneti* i *E. necatrix*.

Dane dotyczące skuteczności związku antybiotycznego 53 607 i jego soli wobec zakażeń kokcydialnych u kurcząt otrzymano w następujący sposób. Grupom 3—5 dniowych kogucików białych leghornów SPF dawano papkową dietę zawierającą związek antybiotyczny 53 607 lub jego sól sodową i/lub potasową, równomiernie rozprowadzaną. Po 24 godzinach na tej racji każdego kogucika inokulowano per os oocystami testowanego gatunku *Eimeria*. Inne grupy 3—5 dniowych kogucików karmiono podobną papkową dietą bez związku antybiotycznego 53 607 lub jego soli. Również te zakażano po 24 godzinach, a stanowiły one zakażoną kontrolę. Jeszcze inną grupę 3—5 dniowych kurcząt karmiono papkową dietą wolną od związku antybiotycznego 53 607 i nie zakażano jej kokcydiami. Te stanowiły kontrolę normalną. Wyniki traktowania oceniano po 5 dniach w przypadku *E. acervulina*, a po 6 dniach dla wszystkich innych

Tabela I

Organizm	MIC, mcg/ml Związek 53 607 (sól sodowa)
Staphylococcus aureus	01A005 0,78
	01A052 0,78
	01A110 1,56
	01A400 1,56
Streptococcus faecalis	02A006 1,56
Streptococcus pyogenes	020203 <0,01
Corynebacterium pyogenes	11D001 25
Bacillus subtilis	06A001 0,39
Bacterioides fragilis	78C004 12,5
	78C009 6,25
	78C010 6,25
Bacteroides vulgaris	78E032 3,12
Haemophilus influenza	54A036 6,25
	54A037 3,12
	54A059 12,5
Pasteurella multocida	59A001 >200
Clostridium perfringens	10A002 0,98
	10A003 0,98
Neisseria sicca	660000 25
Staphylococcus epidermis	01B087R 0,78
	01B111RR 0,78
	01B126 1,56
Fusobacterium necroforum	84C004 3,12
Treponema hyodysenteriae	94A001 0,39
	94A002 0,098

Tabela II

Gatunek zakażający	Dawka (ppm)	Przeciętny stopień ¹ infekcji	Stosunek ¹	Uzysk wagi (%)
Eimeria tenella	200	1,3	0,41	37
	100	1,0 (1,3)	0,32 (0,37)	57 (60)
	50	2,7 (0,3)	0,86 (0,09)	22 (97)
	25	3,0 (1,7)	0,95 (0,49)	47 (102)
Eimeria acervulina	200	1,5	0,75	2
	100	1,2	0,60	22
	50	2,0	1,00	18
	25	2,0	1,00	7
Eimeria necatrix	200	—	—	—
	100	0,0	0,00	69
	50	0,2	0,11	99
	25	0,6	0,33	111
Eimeria maxima	200	1,5	0,94	10
	100	0,8	0,50	37
	50	1,0	0,63	70
	25	1,4	0,88	51
Eimeria brunetti	200	—	—	—
	100	0,4	0,22	47
	50	1,0	0,55	49
	25	2,6	1,44	47

¹ Kryteria stosowane do mierzenia czynności przeciwookcydialnej składały się z oceny wżerów od 0 do 4 dla *E. tenella*, według J. E. Lynch „A New Method for the Primary Evaluation of Anticoccidial Activity”. Am. J. Vet. Res. 22:324—326 (1961); i 0 do 3 dla innych gatunków, w oparciu o modyfikację systemu oceny opracowaną przez J. Johnsona i W. H. Reida, „Anticoccidial drugs. Lesion Scoring Techniques in Battery and Floor Pen Experiments in Chicks”, Exp. Parasit. 28:30—36 (1970). Ustalono stały stosunek dzieląc ocenę wżerów w każdej traktowanej grupie przez ocenę wżerów grupy zakażonej (kontrolę).

zakazeń. W tabeli II zestawiono uzyskane wyniki.

Wartość karmienia zwierzęcia ogólnie określano bezpośrednio przez karmienie zwierzęcia. Brytyjski opis patentowy nr 1 197 826, podaje szczegóły oraz technikę pierwszego żołądka *in vitro*, gdzie zmiany powodowane w pożywieniu przez mikroorganizmy mierzy się łatwiej i z większą dokładnością w ocenie pożywienia zwierzęcia. Technika ta obejmuje stosowanie aparatu, w którym proces trawienia zwierząt prowadzi się i bada *in vitro*. Pożywienie zwierzęcia, inokulum żołądka i różne promotory wzrostu wprowadza się do i pobiera z jednostki laboratoryjnej w starannie regulowanych warunkach, a zachodzące zmiany bada się krytycznie i progresywnie w trakcie konsumpcji pożywienia przez mikroorganizmy. Wzrost zawartości kwasu propionowego w płynie żołądkowym wskazuje na żądaną odpowiedź w ogólnej czynności żołądka przez promotor wzrostu w składzie pożywienia. Zmianę zawartości kwasu propionowego wyraża się jako procent zawartości kwasu propionowego znalezionej w płynie żołądkowym kontroli. Długotrwałe badania żywienia *in vitro* stosuje się do wykazania wiarogodnej korelacji między wzrostem kwasu propionowego w płynie żołądkowym i lepszą czynnością zwierząt.

Płyn żołądkowy pobiera się sondą od krwi, karmionej handlową racją tuczącą plus siano. Płyn żołądkowy natychmiast przesącza się przez płótno do cedzenia sera i 10 ml dodaje do 50 ml stożkowego naczynia zawierającego 400 mg standardowego substratu (68% skrobia kukurydziana + 17% celulozy + 15% ekstrahowanej mąki sojowej), 10 ml buforu pH 6,8 i badany związek. Naczynia gazuje się w ciągu około 2 minut azotem wolnym od tlenu i inkubuje we wstrząsowej kąpeli wodnej w ciągu około 16 godzin. Wszystkie próby prowadzi się w trzech powtórzeniach.

Po inkubacji, 5 ml próbki miesza się z 1 ml 25% kwasu metafosforowego. Po 10 minutach dodaje się 0,25 ml kwasu mrówkowego i wiruje mieszaninę przy 1500 obrotach na minutę w ciągu 10 minut. Następnie próbki analizuje się chromatografią gazową, sposobem według D.W. Kellog, *J. Dairy Science*, 52, 1690 (1969). Oznacza się wysokości pików dla kwasu octowego, propionowego i masłowego dla próbek z inkubowanych kolb nietraktowanych i traktowanych.

Badany powyższą procedurą *in vitro*, związek antybiotyczny 53 607 na poziomie 20 mikrogramów na milimetr dał około 57% wzrost produkcji kwasu propionowego w stosunku do tego produktu w roztworze kontrolnym bez dodania antybiotycznego związku 53 607. Dla porównania, dostępna w handlu monensyna (inny policykliczny antybiotyk eterowy), na poziomie 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ daje około 20% wzrost kwasu propionowego w stosunku do kontroli (*J. Amer. Chem. Soc.* 89, 5737 (1969)).

Porównany z salinomycyną (*J. Antibiotics*, 27:814, (1974) związek antybiotyczny 53 607 dawał około 43% wzrost kwasu propionowego na poziomie 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ i około 40% wzrost przy 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, w porównaniu ze wzrostem o około 52% dla salinomycyny przy 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Bazując na tych danych można przewidzieć, że

związek antybiotyczny 53 607 polepszy. Utylizację paszy przez zwierzęta przeżywające, takie jak bydło i owce i przez zwierzęta jednożołądkowe, takie jak świnia i króliki. Związek antybiotyczny 53 607 można dodawać do kompozycji paszowej w postaci wolnego kwasu, soli sodowej, soli potasowej lub ich mieszanin. Surowe postaci związku antybiotycznego 53 607 lub suszoną brzeczkę fermentacyjną zawierającą antybiotyk można dodawać do kompozycji paszowej na żądanym poziomie stężenia aktywności.

Poniższe przykłady pełniej ilustrują operacje według wynalazku lecz należy rozumieć, że wynalazek nie jest ograniczony przykładami.

Przykład I.

a) Inokulum. Sporządzono sterylną pożywkę wodną o następującym składzie:

Składnik	gramów/litr
Preparat Cerelese	10
skrobia	20
ekstrakt z drożdży	5
Preparat NZ Amine YTT *	5
wodorofosforan dwupotasowy	0,5
mączka mięsna	5
chlórek kobaltu	0,002
węglan wapnia	4
pH 7,1—7,2	

Komórki ze skosu *Streptomyces halstedii* ATCC 31812 przeniesiono do serii kolb o pojemności 300 ml zawierających 40 ml tej sterylnej pożywki i wstrząsano na wstrząsarce obrotowej w temperaturze 28—36°C, w ciągu 3—4 dni.

b) Fermentacja. Podwielokrotność rosnącej hodowli, wystarczającą do uzyskania 2% objętość/objętość inokulum przeniesiono do czterolitrowych fermentorów zawierających po dwa litry następującej sterylnej pożywki:

Składnik	gramów/litr
Preparat Cerelese	10
Preparat NZ Amine A	5
skrobia	20
ekstrakt z drożdży	5,0
węglan wapnia	1,0
woda — uzupełnienie do 1000 ml	

Fermentację prowadzono w temperaturze 30°C przy mieszaniu z szybkością 1700 obrotów na minutę (RPM) i napowietrzania jedna objętość powietrza na objętość brzeczki na minutę do zaobserwowania znacznej aktywności (bazowanej na oznaczeniu krążkowym antybiotyku wobec *B. subtilis* ATCC 6633 *), zwykle 3—5 dni. Całą brzeczkę

* Rejestrowany znak handlowy enzymatycznego hydroлізу kazeiny, Humko Sheffield Chemical Co., Inc.

• Bioaktywność brzeczki i następne strumienie odzysku kontrolowano stosując wrażliwy szczep *Bacillus subtilis* ATCC 6633 lub *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Składniki w brzeczce i strumieniach odzysku uwidoczono stosując płyty z żelem krzemionkowym w następującym układzie: octan etylu/metanol 9:1 lub chloroform/metanol 9:1, a płyty spryskiwano waniliną (3 g waniliny w 97,0 ml etanolu i 3,0 ml stęż. kwasu siarkowego) i następnie ogrzewano w 80°C. Alternatywnie, płyty nakładano na agar, posiewano *S. aureus* lub *B. subtilis* do których dodawano 1,0 ml 1% roztworu tetrazolowego i inkubowano w 37°C w ciągu 18 godzin, dla uwidocznienia antybiotyku (klarowne obszary wobec różowego tła).

sączono przy obojętnym pH, stosując środek ułatwiający sączenie (Super Cel lub Celite), przesącz ekstrahowano ketonem metyloizobutylovym lub n-butanolem. Fazę organiczną oddzielono od fazy wodnej przez zassanie i przesączano dla usunięcia zawieszzonego materiału. Placek filtracyjny zawieszono w metanolu, sączono, odparowywano metanol, a pozostałość ekstrahowano tym samym rozpuszczalnikiem, jaki stosowano do ekstrakcji brzo-

czki. Ekstrakty połączone i odparowano w próżni, otrzymując lepki olej. Olej zawieszono w heptanie, mieszano z żelem krzemionkowym i sączono. Placek filtracyjny wielokrotnie przemyto heptanem, a produkt eluowano stopniowo samym chloroformem, mieszaninami chloroformu i octanu etylu i na końcu octanem etylu. Po chromatografii cienko-

warstwowej (TLC) i analizie biologicznej frakcji, frakcje aktywne połączone i odparowano w próżni, a pozostałość rechromatografowano, otrzymując związek antybiotyczny 53 607 w postaci ciała stałego. Widmo w podczerwieni (pastylka KBr) mikronów: 2,95, 3,42, 6,00, 6,37, 6,85, 7,14, 7,30, 7,65, 7,90, 8,10, 9,05, 9,15, 9,67, 10,00, 10,18, 10,53, 11,15, 11,40, 11,75, 13,25. Stwierdzono, że jest on rozpuszczalny w chloroformie, octanie etylu, metanolu i ketonie metyloizobutylovym nierozpuszczalny w wodzie.

Przykład II. Sporządzono inokulum jak opisano w poprzednim przykładzie, z tym, że stosowano 700 ml pożywki na kolbę, a inokulum we wstrząsanych kolbach fermentowano w ciągu 3—4 dni w temperaturze 28°C. Stosowano butle z dwoma ramionami bocznymi.

Fermentor o pojemności 6435 l zawierający 4540 l poniższej sterylnej pożywki inokulowano sześcioma litrami (0,1%) powyższego inokulum:

Pożywka fermentacyjna

Składnik	gramów/litr
Preparat Caselese	1,0
kazeina	5,0
skrobia	5,0
namok kukurydziany	5,0 ml
węglan wapnia	3,0
chlorek kobaltu	0,002
woda do 1 litra	
pH 6,9—7,0	

Fermentor utrzymywano w temperaturze 28°C, przy napowietrzaniu i mieszaniu z szybkością 1700 RPM. Po 120 godzinach fermentor opróżniono. Całą brzo-

czkę 4540 l ekstrahowano 945 litrami ketonu metyloizobutylovego, warstwy rozdzielono w ekstraktorze (Podbielniak), a fazę organiczną odparowano w próżni, otrzymując około 30 l oleju. Olej dalej odparowywano w próżni w wyparce obrotowej. Pozostały syrop zawieszono w heptanie, mieszano z żelem krzemionkowym i sączono, kilkakrotnie przemywając heptanem. Przemyty placek filtracyjny przerobiono jak opisano w przykładzie I, otrzymując 300 g oleju. Olej rozpuszczono w ma-

łej ilości chloroformu, roztwór wylano na filtr (Lapp) zawierający 3,5 kg żelu krzemionkowego (Merck, gatunek 60), a złożo żelu krzemionkowego przemyto kolejno porcjami po 5 galonów chloro-

formu, octanu etylu i acetonu. Frakcje badano

chromatografią cienkowarstwową. Stwierdzono, że produkt znajduje się prawie wyłącznie we frakcji octanu etylu. Pozostałe frakcje odrzucono, frakcję octanu etylu odparowano do sucha w próżni, otrzymując 150 g koncentratu. Koncentrat dalej oczyszczano chromatografią na 8,0×1000 cm kolumnie wypełnionej żelem krzemionkowym (Merck, gatunek 60), przez zawieszenie w octanie etylu. Kolumnę eluowano octanem etylu, pobierając 1 litrowe frakcje z szybkością 60 ml/minutę. Frakcje zawierające produkt połączone i odparowano w próżni, otrzymując 85 g produktu.

Produkt przepuszczono przez kolumnę zawierającą jeden kilogram Sephadex LH-20, eluując metanolem z szybkością przepływu 0,25 ml/minutę. Pobierano frakcje 300 ml. Połączenie frakcji zawierających produkt i odparowanie rozpuszczalnika dało 30 g materiału stałego. Materiał ten rozpuszczono w 500 ml chloroformu, roztwór przemyto taką samą objętością 5% buforu NaH₂PO₄, który doprowadzono do pH 4,5 za pomocą 85% kwasu fosforowego. Oddzielono fazę organiczną, przemyto 500 ml 5% buforu Na₂HPO₄ doprowadzonego do pH 9,0 za pomocą 1N wodorotlenku sodu. Ekstrakt wysuszone następnie nad bezwodnym siarczanem sodu i odparowano do sucha w próżni. Pozostałość rozpuszczono w acetonie i pozostawiono do krystalizacji w lodówce. Kryształy zebrano przez sączenie i wysuszone pod wysoką próżnią w temperaturze pokojowej, otrzymując 14 g soli sodowej związku antybiotycznego 53 607, temperatura topnienia 199—204°C.

Skręcalność optyczna: (alfa)_D + 44° (c=1, chloroform)

(alfa)_D + 37° (c≡a, metanol).

Widmo w nadfiolecie: lambda_{max}, 233 nm (metanol)

$$E_{1\%}^{1\text{cm}} = 212$$

Widma w podczerwieni (pastylka KBr) mikronów: 2,95, 3,42, 6,00, 6,37, 6,85, 7,14, 7,30, 7,65, 7,90, 8,10, 9,05, 9,15, 9,67, 10,00, 10,18, 10,53, 11,15, 11,40, 11,75, 13,25.

Widmo w podczerwieni przedstawiono na figurze 1. Analiza elementarna: C 57,54; H 7,74; N 0,0.

Stosując bufor KH₂PO₄ (pH 4,5) i K₂HPO₄ doprowadzony do 9,0 za pomocą 1N wodorotlenku potasu w powyższej procedurze, w podobny sposób otrzymuje się sól potasową związku antybiotycznego 53 607. Podobnie otrzymuje się sól amonową, stosując w powyższej procedurze (NH₄)H₂PO₄ i (NH₄)₂HPO₄.

Przykład III.

Część powyższej soli sodowej związku antybiotycznego 53 607 rozpuszczono w octanie etylu, dodano wody i za pomocą 85% kwasu fosforowego doprowadzono fazę wodną do pH 4,5. Oddzielono warstwę organiczną, wysuszone (Na₂SO₄) i odparowano w próżni, otrzymując wolny kwas związku 53 607, temperatura topnienia 84—94°C. Analizę elementarną otrzymano na próbce suszonej w ciągu nocy pod wysoką próżnią w temperaturze pokojowej: C 64,96, H 8,91; N 0,0.

Stwierdzono, że kwas jest nierozpuszczalny w wodzie; rozpuszczalny w chloroformie, octanie etylu, metanolu i ketonie metyloizobutylovym.

$(\alpha)_D^{20} + 74,5^\circ$ (c=1, chloroform)

$(\alpha)_D^{20} + 49,7^\circ$ (c=1, metanol)

Widmo w nadfiolecie: λ_{max} 233 nm (metanol)

$$\begin{aligned} 1\% \\ E &= 198. \\ 1 \text{ cm} \end{aligned}$$

Widmo w podczerwieni (pastylka KBr) mikronów: 2,95, 3,45, 6,00, 6,85, 7,28, 8,13, 9,05, 9,67, 10,20, 10,55, 11,15, 11,48.

Widmo jest przedstawione na figurze 2.

Sól barową sporządza się przez wstrząsanie 2,0 g wolnego kwasu rozpuszczonego w 80 ml octanu etylu z taką samą objętością wody zawierającej 2,4 g ośmiowodzianu wodorotlenku baru. Rozdziela się warstwy, fazę organiczną przemywa świeżym roztworem $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, suszy (Na_2SO_4) i odparowuje w próżni, otrzymując żadaną sól związku antybiotycznego 53 607.

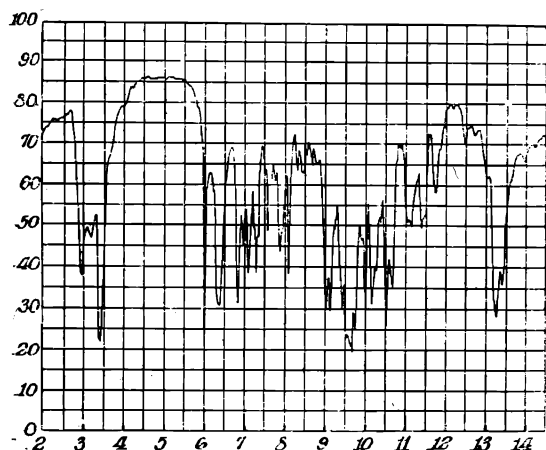
Sól wapniową otrzymuje się powyższą procedurą, lecz stosując zamiast ośmiowodzianu wodorotlenku baru wodorotlenek wapnia.

Przykład IV.

Przeprowadza się procedurę z przykładu I lecz stosując 4% objętościowo/objętościowych inokulum w czterolitrowych fermentorach, zawierających po dwa litry następującej sterylnej pożywki:

Składnik	gramów/litr
Preparat Cerelosa	10
skrobia kukurydziana	10
mąka sojowa	10
węgiel wapnia	1

Fig. 1.



fermentujący materiał stały kukurydzy 5
chlorek sodu 5
pH 7,0

Fermentację prowadzono w ciągu dwóch dni w temperaturze 36°C, przy mieszaniu z szybkością 1700 RPM i przepuszczeniu powietrza z szybkością 2 objętości/1 objętość brzezki na minutę. Całą brzezkę ekstrahowano chloroformem i przerebiono jak opisano w przykładzie I, otrzymując 10 związek antybiotyczny 53 607 w postaci mieszaniny soli sodowej, potasowej i wapniowej.

Gdy powtarza się powyższą procedurę stosując 15 pożywkę fermentacyjną zawierającą zamiast cerelezy glicerynę, zamiast fermentującego materiału stałego kukurydzy mączkę rybną lub mąkę z nasienia bawełny i prowadząc fermentację przy pH 8,0, w temperaturze 28°C w ciągu 6 dni, wyniki są zasadniczo nie zmienione.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania nowego, kwasowego, policyklicznego antybiotyku eterowego o wzorze podanym na załączonym rysunku, **znamienny tym**, że prowadzi się hodowlę mikroorganizmu *Streptomyces halstedii* ATCC 31812 w wodnych pożywkach hodowlanych zawierających asymilowane źródła węgla, azotu i nieorganicznych soli, w warunkach podpowierzchniowej fermentacji aerobowej, aż do uzyskania znacznej ilości tego antybiotyku.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że antybiotyk wydziela się z pożywki fermentacyjnej.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że 35 pożywkę fermentacyjną doprowadza się do stanu suchego.

Fig. 2.

