

PRIMJENA LIOFILIZACIJE ZA TRAJNO ČUVANJE STREPTOMICETA, PROIZVOĐAČA OKSITETRACIKLINA

With Summary in English

EMIN KAPETANOVIĆ i ZLATKO PAVLETIĆ

(Istraživački sektor tvornice PLIVA u Zagrebu i Institut za botaniku Sveučilišta
u Zagrebu)

Primljeno 18. 11. 1971.

Uvod

Trajno čuvanje mikrobnih kultura potrebno je u istraživanjima (genetskim, taksonomskim, fiziološkim i ekološkim), u proizvodnji (standardizacija cjepiva i prinosa) te za stvaranje i održavanje zbirki kultura.

Posebno, trajno čuvanje sojeva unutar vrsta roda *Streptomyces* još je aktualnije zbog njihove jako izražene varijabilnosti (Duggar et al. 1954); racioniranja poslova vezanih za očuvanje zbirki kultura osobito taksonomski neodređenih izolata, pripadnika roda *Streptomyces* (Cochrane 1958; Raper 1954), i široke primjene streptomiceta u industrijskoj proizvodnji antibiotika.

Otprije primjenjivani postupci i metode za trajno čuvanje i održavanje mikrobnih kultura osiguravali su kratkoročno čuvanje, a manje-više pogodni su samo za određenu grupu mikroorganizama, dok su za druge grupe manje podesni ili sasvim nepodesni. Tako npr. održavanje kultura: na sporulacionim agarnim podlogama unutar širokog raspona temperatura; pod sterilnim parafinskim uljem izraslih kultura na hranjivim podlogama bilo je pogodno samo za kvasce i asporogene gljive; kod niskih temperatura na agarnim podlogama koje sadržavaju minimum organskih tvari; na sterilnoj zemlji raznog podrijetla; čuvanje na sterilnom pijesku raznog podrijetla i sl.

Teoretske probleme liofilizacije obradili su L. Rey (1964, 1966); H. T. Meryman (1966) i R. Mata (1966).

Liofilizacija se primjenjuje za dugoročno čuvanje raznih tipova mikrobnih kultura. NATIONAL COLLECTION OF TYPE CULTURES (NCTC) iz Londona uveo je metodu liofilizacije kultura mikroorganizama još godine 1949, a NATIONAL COLLECTION OF INDUSTRIAL BACTERIA (NCIB) iz Aberdeena (Škotska) primjenjuje liofilizaciju za dugoročno čuvanje sojeva vrsta roda *Streptomyces*.

Sastav podloge u kojoj se vrši smrzavanje kultura — radi zaštite stanica od oštećenja za vrijeme smrzavanja, sušenja u vakuumu i resuspendiranja liofilizata — od izvanredne je važnosti.

M. Herold et al. (1957), uz ostale tipove podloga za liofilizaciju mikroorganizama, spominju mliječnu sirutku, a za rod *Penicillium* i rod *Actinomyces (Streptomyces)*, kao naročito podesnu, smjesu gline i pijeska.

V. D. Kuznetsov et al. (1962) uzimali su spore streptomiceta (aktinomiceta) i plijesni bez »konzervansa« ili u smjesi saharoze /10⁰% (w/v)/ i želatine /1⁰% (w/v)/, smrzavali 20 min. u smjesi krutog ugljičnog dioksida i etilnog alkohola (od — 60 do — 68 °C) te liofizirali u vakuumu kod cca 100 mμ. Maksimalna zaostala voda u liofilizatima je do 5⁰%. Smatraju da je liofilizacija najbolja metoda za čuvanje aktinomiceta koji proizvode antibiotike, u usporedbi sa kulturama čuvanim na kvarcnom pijesku, pod sterilnim uljem, na prosu ili agarnim podlogama, jer osigurava nepromijenjenu produktivnost sojeva u trajanju od jedne do četiri godine.

D. A. Hopwood i H. M. Ferguson (1969) uveli su novu, brzu metodu za liofilizaciju izolata i mutanata vrste *Streptomyces coelicolor* na odrescima Whatman papira. Liofilizate su očuvali 10 mjeseci na + 4 °C i + 37 °C, bez pojave razlika u gustoći kultura prije i poslije liofilizacije. Metodu smatraju općenito pogodnom za sve streptomicete. Preliminarno su upotrebljavali dvije podloge: 3⁰% (w/v) želatine sa 3⁰% (w/v) glukoze, odnosno 10⁰% (w/v) peptona sa 10⁰% (w/v) glukoze, a u svojem konačnom postupku liofilizacije podlogu sa 10⁰% (w/v) obranog mlijeka (Bacto Skim Milk).

Konačno, u brojnim patentnim postupcima za proizvodnju tetraciklinskih antibiotika uz pomoć različitih vrsta roda *Streptomyces* navodi se održavanje ili trajno čuvanje tih kultura u liofiliziranom obliku. Tako npr., prema G. Fabrizio et al. (1964) u British Patent Specif. 1,016, 961, *Streptomyces capuensis nov. spec.* (CBS 113.63), proizvodni soj oksitetraciklina, održavan je u liofiliziranom obliku, a supkulture priređivane na kosom agaru. F. Ulak (1963) u British Patent Specif. 989,406 navodi da se proizvodni soj tetraciklina, *Streptomyces species 88* (ATC C 2112), može očuvati u liofiliziranom obliku tijekom 2 godine bez gubitka aktiveta.

U okviru ovog rada opisan je postupak liofilizacije i iznesena opća iskustva u primjeni metode liofilizacije sojeva roda *Streptomyces*, proizvođača antibiotika oksitetraciklina.

Materijal i metode

Za ispitivanja izabrani su proizvodni sojevi T₃ i T₆ vrste *Streptomyces rimosus* iz Zbirke mikroorganizama Tehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izolati iz tala u prirodi, pohranjeni u Zbirci kultura Mikrobiološkog laboratorija Odjela za istraživanje nižega bilja Instituta za botaniku Sveučilišta u Zagrebu, a označeni sa BIM.

U pravilu, izolirane su monosporne kolonije postupkom prirodne selekcije iz populacija soja na krutnoj podlozi (P—1). Izolati su bili provjerenih morfoloških karakteristika i proizvodnog kapaciteta antibiotika oksitetraciklina. Svaki izolat je prenijet na kosi agar (»kontrolna« kultura), a s kosog agara priređena vodena suspenzija u svrhu testiranja prinosa antibiotika »kontrolne« kulture, i kao polazni materijal za liofilizaciju kulture.

Tabela I: Sastav upotrijebljenih hranjivih podloga

Table I: Composition of the media

P-1*Podloga za kosi agar (Medium for slant)*

		% (w/v)
Sladni ekstrakt, »Difco«	(Bacto Malt Extract)	1,0
Kvašičev ekstrakt, Difco«	(Bacto Yeast Extract)	0,4
Glukoza	(Bacto Dextrose)	0,4
Agar, »Difco«	(Bacto Agar)	2,0
Sterilizacija	(Sterilization)	20 min, 115 °C

P-2*Podloga za uzgoj vegetativne faze na treslici
(Medium for development of vegetative phase on shaker)*

		% (w/v)
Saharoza, komerc.	(Saccharose, Sucrose), commerc.	3,0
Kukuruzni ekstrakt, dehidr.	(Corn steep, dehydr.)	0,875
Kalcijev karbonat p. a.	(Calcium carbonate p. a.)	0,7
Amonijev sulfat p. a.	(Ammonium sulfate p. a.)	0,2
Sterilizacija	(Sterilization)	45 min, 120 °C

P-3*Podloga za fermentaciju na treslici
(Medium for fermentation on shaker)*

		% (w/v)
Škrob kukuruzni	(Corn starch)	5,5
Kukuruzni ekstrakt, dehidr.	(Corn steep dehydr.)	0,75
Kalcijev karbonat precip.	(Calcium carbonate precip.)	0,7
Amonijev sulfat	(Ammonium sulfate)	0,85
Amonijev klorid	(Ammonium chloride)	0,2
Mangan sulfat	(Manganese sulfate)	0,014
Kobalt klorid	(Cobalt chloride)	0,5 mg
Sojino ulje	(Soybean oil)	1,0
Sterilizacija	(Sterilization)	45 min, 120 °C

L-1*Podloga za liofilizaciju mikrobnih kultura
(Medium for lyophilization of microbial cultures)*

		% (w/v)
Želatina	(Gelatine)	3—5
Glukoza	(Glucose, Bacto. Dextrose)	3
Sterilizacija	(Sterilization)	20 min, 115 °C

Upotrijebljene hranjive podloge (Tabela I) primijenjene su otprije za semikontinuirani uzgoj inokuluma za proizvodnju oksitetraciklina (Bošnjak i Kapetanović 1968), a označene su kao P—1 (kruta podloga za kosi agar), P—2 (podloga za uzgoj vegetativne faze), P—3 (podloga za fermentaciju na treslici) i L—1 (podloga za liofilizaciju).

Postupak liofilizacije kultura i njihova kontrola

Postupak liofilizacije preliminarno je provjeren za dugoročno čuvanje kultura *T₃ Streptomyces rimosus* a nakon toga primijenjen za liofilizaciju svih ispitivanih sojeva.

Od »kontrolne« kulture na kosom agaru priredi se sterilnom destiliranom vodom suspenzija kulture i prenese u sterilne kivete volumena 10 ml koje se centrifugiraju na električnoj centrifugi (TEHTNICA, Železniki, tip LC—72) 30 min. na 3000 o/min. Nakon toga se 50% supernatanta sterilno dekantira i nadopuni sterilnom podlogom L—1. Smjesa se dobro izmiješa i sterilnom pipetira po 0,2 do 0,3 ml u sterilne epruvete (Ø epruveta 4—10 x 100 mm ili Ø 5—6 x 120 do 135 mm). Zatim se čepovi epruveta nešto skrate, spale na plamenu i sterilnom mikrobiološkom iglom potisnu do oko 2/3 visine epruveta (cca 7—8 cm od dna). Dio epruveta se prenese u termos-bocu koja sadržava kruti ugljični dioksid i nešto etanola, radi smrzavanja kultura. Kulture se drže na temperaturi od —55 do —85 °C, optimalna temperatura je od —50 do —55 °C.

Od svake kulture dio epruveta sa suspenzijom ostavlja se nesmrznut radi provjere sterilnosti i gustoće »polazne« kulture.

Epruvete sa smrznutom kulturom zatim se prenese u aparat za liofilizaciju*, koji je već otprije pripremljen, pregledan i uključen u rad. Nakon završene liofilizacije, epruvete se izvade iz aparata, iznad mikrobiološkog čepa na plameniku utanje se u kapilaru (Ø 2—3 mm, dužine 20 mm), a zatim pod vakuumom zatale. Liofilizirane kulture (lioofilizati) čuvaju se u hladioniku (od +2 do +5 °C).

Odmah nakon završene liofilizacije dio liofilizata svake kulture uzme se radi utvrđivanja preživljavanja kulture, a kao kontrola služe kulture u epruvetama koje nisu liofilizirane. Kontrola sterilnosti liofilizata vrši se naciepljivanjem u hranjivi bujon i inokulacijom na ploče koje sadržavaju podlogu P—1.

Kontrola prinosa liofilizata obavlja se na taj način što se liofiliziranom kulturom naciepi 50 ml podloge P—2 u Erlenmeyerovoj tikvici volumena 500 ml, koja se inkubira na 28—30 °C na treslici sa 200—220 o/min. Uzgoj traje 24—30 sati. Tako uzgojenom kulturom (10% v/v) cijepi se 50 ml podloge P—3 u Erlenmeyerovoj tikvici volumena 500 ml i inkubira 140—144 sata na istoj treslici. Prinosi oksitetraciklina u svim slučajevima određivali su se kolorimetrijskom metodom (Monastero et al. 1951), a izražavani su kao postotak u odnosu na prinos »kontrolne« kulture istog soja.

Rezultati i diskusija

Tijekom višegodišnje primjene postupka liofilizacije za trajno čuvanje proizvodnih sojeva *T₃* i *T₆* vrste *Streptomyces rimosus* i izolata iz prirode provjeravana je njihova morfogenetska stabilnost i stabilnost prinosa oksitetraciklina.

* Upotrijebljena su dva tipa aparata za liofilizaciju:

1. LEYBOLD tip 92/244, proizvod tvornice LEYBOLD HOCHVAKUUM ANLAGEN GMBH, KÖLN
2. GEFRIERTROCKENANLAGE DELTA I/a, proizvođač MARTIN CHRIST WERK, AICHACH.

Objema aparatima rukovalo se prema uputama proizvođača.

Opisani postupak liofilizacije u pogledu preživljavanja i morfogetske stabilnosti kultura pokazao se u većini slučajeva vrlo uspješan. Neki primjeri izneseni su u tabeli II. Broj preživjelih spora (40—90, 8%) zadovoljava namijenjenoj svrhi.

Rast liofiliziranih kultura na krutoj podlozi (P—1) nije se znatno razlikovao od rasta neliofiliziranih (»kontrolnih«) kultura: populacije kultura su neizmijenjeno zadržavale sve bitne »polazne« morfološke karakteristike. Samo u neznatnom broju slučajeva (npr. soj T₆—429, T₆—483 i BIM 197) uočena je heteromorfnost liofiliziranih kultura, u usporedbi s »polaznim« kulturama, u vezi s pojavom sitnih kolonija (5%), nestajanja kapljica eksudata u centru kolonija, odnosno razlika u intenzitetu topiva pigmenta u podlozi. Pojava tih razlika vjerojatno se može pripisati mikroekološkim uvjetima (različnost sastava podloge, temperature i sl.).

Rast liofilizata u tekućoj podlozi (P—2) — zbog gotovo potpuno ostvarene anabioze — bio je, razumljivo se, sporiji (prosječno 10—16 sati) u odnosu na rast »kontrolne« kulture. Liofilizati asporogenih kultura (npr. T₆—A—447) rasli su brže (prosječno 4—6 sati) u odnosu na liofilizate sporogenih kultura.

Pokazalo se da zaostala voda u liofilizatu sprečava postizavanje potpune anabioze, pa je stoga potrebno održavati vodu unutar uskog raspona i na niskom nivou.

Kvaliteta mikrobioloških čepova od vate utječe znatno na tok procesa liofilizacije, osobito u fazi sušenja u vakuumu, pa izradbi tih čepova treba posvetiti punu pažnju, naročito što se tvrdoće tiče.

S obzirom na stabilnost prinosa antibiotika oksitetraciklina (tabela III), prinosi testiranih liofilizata često se razlikuju od prinosa »kontrolnih« kultura i unatoč održavanju istih uvjeta tijekom testiranja, naročito u laboratoriju. Za pojedine liofilizate testiranja su ponovljena i dala su rezultate približno istih odstupanja. Nisu rijetki slučajevi ostvarenih prinosa iznad kontrolnih.

Ostvareni prinosi oksitetraciklina u proizvodnom mjerilu vrlo su povoljni i standardni i tijekom duže upotrebe liofilizirane kulture za pripremu cjepiva.

Z a k l j u č a k

1) Opisani postupak liofilizacije pogodan je za dugoročno čuvanje ispitivanih sojeva,

2) Upotrijebljeni aparati za liofilizaciju prikladni su za opisanu svrhu i daju liofilizate iste kvalitete. Model DELTA I/a većeg je kapaciteta i zbog toga podesniji u proizvodne svrhe kao i u svrhu održavanja većih zbirki kultura,

3) Optimalna temperatura smrzavanja kultura je od — 50 do —55 °C.

4) Zaostalu vodu u liofilizatima-kao bitan faktor za postizavanje anabioze a time i trajnosti kultura — treba održavati na istom, prethodno višekratno provjerenom nivou,

5) Liofilizirane kulture zadržale su stabilne prinose antibiotika oksitetraciklina tijekom četverogodišnjeg ispitivanja,

6) Poroznost i tvrdoću mikrobioloških čepova od vate za epruvete u kojima se vrši liofilizacija kultura treba ujednačiti radi uspješnog tijeka postupka sušenja u vakuumu.

Table II — Morfologija i broj kolonija u populaciji nekih sojeva *Streptomyces* na krutoj podlozi (P-1) prije i poslije liofilizacije

Table II — Morphology and number of colonies in population of some *Streptomyces* strains on agar medium P-1 before and after lyophilization

Soj	Neliofilizirana (»polazna«) kultura		Liofilizirana kultura	
	Opis populacije — glavne karakteristike	Broj kolonija *	Opis populacije — glavne karakteristike	Broj kolonija * % preživjelih kolonija
Strain	Nonlyophilized (»starting«) culture	Number of colonies *	Lyophilized culture	% of surviving colonies
	Description of population — main characteristics		Description of population — main characteristics	
T ₆ -374	Sve tipske oznake soja, aeralni micelij tamno siv. All characteristics of strain, aeral mycelium dark gray.	3,5 · 10 ⁶	Isti kao prije liofilizacije. Same as before lyophilization.	2,0 · 10 ⁶ 57,1
T ₆ -429	Supstratni micelij vrlo snažan, aeralni micelij smeđe siv. Substrate mycelium very abundant, aeral mycelium brownish gray.	4,5 · 10 ⁶	Nepromijenjen, oko 5% sitnih kolonija. Unchanged but 5% small colonies.	3,5 · 10 ⁶ 77,7
T ₆ -A 447	Asporogena kultura, kolonije glatke. Uzak rub kolonija. Asporogenic culture, flat colonies, edge of colonies tight.	—	Nepromijenjen. Unchanged.	—
T ₆ -483	Sve tipske oznake soja. Arealni micelij čokoladno smeđe boje. Već kolonije sa eksudatom u centru. All type characteristics of the strain. Aeral mycelium chocolate brown. Center of bigger colonies with drops of exudate.	2,4 · 10 ⁶	Nepromijenjena morfologija osim što nema eksudata u centru kolonija. Unchanged, but exudate absent from center of colonies.	1,0 · 10 ⁶ 40,0

T ₄ -II-36	Sasvim uniformna populacija. Aeral-micelij zlatno žut. Total uniformity of colonies. Aeral mycelium golden yellow.	5,5 · 10 ⁶	Nepromijenjen. Unchanged.	5,0 · 10 ⁶	90,8
T ₆ -II-140	Kolonije sa uleknućem u centru. Kod kolonija većeg Ø veće udubljenje. Kolonije hrpapave. Aeralni micelij smeđe do čokoladno smeđe boje. The hole in the center of colonies especially in greater colonies. Rough colonies. Aeral mycelium brown to chocolate brown.	2,5 · 10 ⁶	Morfologija neizmijenjena ali rast kolonija nije istovremen. Morphology unchanged but the growth of colonies is not simultaneous.	1,0 · 10 ⁶	40,0
T ₄ -II-171	Tipske oznake soja. Aeralni micelij raspoređen u koncentrične zone. All basic characteristics of the strain. Aeral mycelium in concentric rings.	5,5 · 10 ⁶	Nepromijenjen. Unchanged.	5,0 · 10 ⁶	90,8
BIM-196	Uniformna populacija, kolonije glatke, ispućene. Aeralni micelij bijel do smeđe siv. Total uniformity of colonies. Colonies flat, convex. Aeral mycelium white to brownish gray.	4,5 · 10 ⁶	Nepromijenjen. Unchanged.	3,5 · 10 ⁶	77,7
BIM-197	Heteromorfna populacija u pogledu topivog pigmenta u podlozi. Aeralni micelij slabo žut do žuto smeđ. Heteromorphous population in respect of soluble pigment in medium. Aeral mycelium bright yellow to yellowish-brown.	6,0 · 10 ⁶	Uniformna populacija, bez razlike u intenzitetu topivog pigmenta. Boja aeralnog micelija nepromijenjena. Uniformity of population without differences in soluble pigment. Colour of areal mycelium unchanged.	5,0 · 10 ⁶	83,3
BIM-598	Kao soj BIM-196 Same as strain BIM-196	3,5 · 10 ⁶	Nepromijenjen. Unchanged.	2,0 · 10 ⁶	57,1

* Računato na ml uzorka kulture. — Estimated per ml of culture.

Tabela III — Prinosi oksitetraciklina nekih liofiliziranih sojeva streptomyceta**

Table III — Oxytetracycline yields of some lyophilized *Streptomyces* strains**

Soj	Prinos oksitetraciklina nakon čuvanja od				
	1 god.	2 god.	3 god.	4 god.	5 god.
Strain	Oxytetracycline yields after storage of				
	1 year	2 years	3 years	4 years	5 years
T ₆ -374	95	—	—	—	—
T ₆ -429	112 (103)***	—	100	—	—
T ₆ -A 447	97	—	—	—	—
T ₆ -II-36	105	100	108 (104)	110 (106)	—
T ₆ -II-140	85	—	—	—	—
T ₆ -II-171	107	100	—	—	—
BIM-196	109 (106)	—	—	—	—
BIM-197	89	—	—	—	—
BIM-598	109	—	—	100	102

** Prinosi oksitetraciklina izraženi su u % -tku od kontrolnog prinosa (100). Oxytetracycline yields calculated as % compared to the oxytetracycline yield of control culture (100).

*** Prinosi oksitetraciklina ponovljenog testiranja su u zagradama. Oxytetracycline yields of repeated tests are in brackets.

Literatura — References

- Bošnjak, M., and E. Kapetanović, 1968: Pilot plant semicontinuous cultivation of oxytetracycline inoculum, Proceedings of 4th Symposium held in Prague, June 17—21, p. 497—503.
- Cochrane, V. W., 1958: Physiology of fungi, Ed. John Wiley and Sons, Inc. Publ., New York.
- Duggar, B. M., E. J. Backus, and T. H. Campbell, 1954: Types of variation in Actinomycetes, Ann. N. Y. Acad. Sci., 60, Art. 1, 71—85.
- Fabrizio, G., E. Isidori, and G. Aurigemma, 1964: New high yielding methods for producing oxytetracycline, British Patent Specification 1,016,961, Feb. 6.
- Herold, M., M., Vondráček, J. Nečásek, i J. Doskočil, 1957: u knjizi: ANTI-BIOTIKA, Nakl. ČAV, Praha.
- Hopwood, D. A., and H. M. Ferguson, 1969: A rapid method for lyophilizing *Streptomyces* cultures, J. Appl. Bact. 32, 434—436.

- Кузнецов, В. Д., Н. М. Лягина, Е. И. Сорокина и Л. Ф. Абызова, 1962: Некоторые вопросы хранения культур актиномицетов и грибов в лабораторных условиях, Т. 31 (4), 731—737.
- Mata, R., 1966: Lyophilization: present status, *Electron Fis. aplicada* 9 (35), 329—38.
- Meryman, H. T., 1966: *Criobiology*, Acad. Press, London and New York.
- Monastero, F., J. A. Means, T. C. Grenfell, and F. H. Hedger, 1951: Terramycin, Chemical methods of assay and identification, *J. Amer. Pharm. Ass. (Sci. Ed.)* 40, 241.
- Raper, K. B., 1954: Speciation and variation in asexual fungi, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 60, 1, 1—182.
- Rey, L. (Ed.), 1964: *Aspects théoriques et industriels de la lyophilisation*, Hermann, Paris.
- Rey, L. (Ed.), 1966: *Lyophilisation recherches et applications nouvelle*, Hermann, Paris.
- Ulak, F., 1963: A method of obtaining tetracycline, *British Patent Specification* 989, 406, May 22.

SUMMARY

LYOPHILIZATION IN LONG TERM PRESERVATION OF STREPTOMYCES OXYTETRACYCLINE PRODUCING STRAINS

Emin Kapetanović and Zlatko Pavletić

(PLIVA Research Institute, Zagreb and Institute of Botany,
University of Zagreb)

In the course of several years of use of lyophilization for long term preservation of oxytetracycline producing *Streptomyces* strains, their morphogenetic stability and the stability of their antibiotic yields were verified.

The described process of lyophilization, as regards the viability and morphogenetic stability of both sporogenous and the asporogenous forms, has been proved very successful, with few exceptions. Data are given in Table II. Viable spore counts of 40—90.8% were satisfactory.

The growth of lyophilized cultures on agar medium (P—1) did not differ much from the growth of non-lyophilized (control) cultures: the populations of the cultures invariably retained all essential »starting« morphological characteristics. Only in a small number of cases alterations in some lyophilized cultures in comparison with the »starting« cultures were observed (e. g. T₆—429, T₆—483 and BIM—197 in Table II). These differences were manifested by the appearance of small colonies (5%), the disappearance of drops of exudate from the colonies center, or by differences in intensity of soluble pigment in the medium. No reliable explanation has been found for this phenomenon. It can probably be ascribed to microecological conditions (different composition of medium, temperature and the like).

The growth of lyophilizates in a liquid medium (P—2) owing to the almost complete anabiosis, was obviously somewhat slower (it averaged 10—16 hours) in comparison to the control cultures; the lyophilized asporogenous cultures, however, grew faster (4—6 hours) than the lyophilized sporogenous ones (see Table II).

It has been proved that the remaining moisture in the lyophilizates is the limiting factor in attaining anabiosis and that, therefore, it is necessary to maintain the moisture within a narrow range and at a low level.

The quality of cotton plugs considerably influences the process of lyophilization, especially at the stage of drying in the vacuum, so that full attention must be paid to the preparation of these plugs, particularly to their hardness.

With regard to the stability in oxytetracycline antibiotic yields (Table III), the tested lyophilizates have given different yields in comparison to the control cultures, in spite of the same testing conditions in the course of experiments, especially in the laboratory.

Tests with some lyophilized cultures were repeated, and results obtained showed approximately the same differences (Table III, figures in brackets). The yields were often higher than those of the control.

The obtained oxytetracycline yields on a production scale were very favourable and uniform, even in the course of prolonged use of lyophilized cultures for the preparation of inoculum.

The following conclusions are the result of many years of work and of data presented here:

- 1) The described process of lyophilization, as a whole, is suitable for a long term preservation of tested oxytetracycline producing *Streptomyces* strains.
- 2) Both apparatuses used for lyophilization are suitable for the purpose described and produce lyophilizates of uniform quality. The model DELTA I/a is of higher capacity and therefore more suitable for production purposes, and for the maintaining of larger collections of cultures.
- 3) The optimum freezing temperature of the cultures is -50 to -55 °C.
- 4) The remainder of moisture in the lyophilizates — because it is a determinant factor in attaining anabiosis on which the stability of cultures depends — must be kept at the same, previously verified level.
- 5) Lyophilized cultures retained constant oxytetracycline yields in the course of the four-year storage.
- 6) The porousness and the hardness of the microbiological cotton plugs must be standardized for the sake of more successful lyophilization process.

Emin Kapetanović, B. Sc.
PLIVA Research Institute
41000 Zagreb (Jugoslaviya), I. L. Ribara 89

Prof. dr. Zlatko Pavletić
Institute of Botany, University of Zagreb
41000 Zagreb (Jugoslaviya), Marulićev trg 20