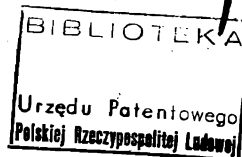




C 12 d 9/18



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 43414

Kl. 6 b, 16/03

Spofa, sdružení podniků pro zdravotnickou výrobu *)

Praga, Czechosłowacja

Sposób wytwarzania tetracykliny

Patent trwa od dnia 26 marca 1959 r.

Pierwszeństwo: 10 kwietnia 1958 r. (Czechosłowacja).

Tetracyklinę, ważny antybiotyk szeregu tetracyklinowego wytwarza się przeważnie na drodze chemicznej, a mianowicie przez katalityczne odchlorowanie tetracykliny, jak to opisano np. w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2699054. Sposób ten wykazuje tę wadę, że daje niską wydajność (około 60% teoretycznej), a materiał wyjściowy i potrzebna aparatura są drogie.

Z tych powodów próbowano często wynaleźć sposób, za pomocą którego możnaby przeprowadzić fermentację przy zastosowaniu mikroorganizmów, które normalnie tworzą chlorotetracyklinę. Jak wynika z literatury fachowej, pewien sukces osiągnięto przez to, że z po-

doła fermentacyjnego usuwano jony chlorkowe albo też wyrugowywano je przez nadmiar jonów bromkowych (porównaj np. Ogawa, Ito, J. Agr. Chem. Soc. Japonia 30, 123 — 125, brytyjskie opisy patentowe nr 773453, 781843 i 775115; szwajcarski opis patentowy nr 324085, opis patentowy Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2734018).

Usuwanie jonów chlorkowych z podłoża fermentacyjnego, względnie ze składników tego podłoża, jest kłopotliwe i drogie. Oprócz tego podłoże zostaje przez to pozbawione ważnych substancji, które konieczne są do uzyskania wysokich wydajności pożądanego produktu.

W innym przypadku jony chlorkowe zostają wyparte przez nadmiar jonów bromkowych z metabolizmu *Streptomyces aureofaciens* albo *Streptomyces viridifaciens*. Jony bromkowe dodaje się w postaci rozpuszczalnych soli, w których brom jest związany jonowo, jak bro-

*) Właściciel patentu oświadczył, że współtwórcami wynalazku są Karel Culik, Eduard Belik, Milos Herold, Josef Palkoska i Jaroslav Dasek.

mak sodowy. Požadany sol osiąga się jednak tylko wtedy, jeżeli te fizjologicznie obce jony znajdują się w podłożu w znacznej koncentracji. Tworzenie się niepożądaney chlorotetracykliny zostaje wprawdzie zahamowane, równocześnie jednak całkowita wydajność procesu fermentacji zostaje obniżona, przez inhibujące działanie jonów bromowych.

Przedmiotem wynalazku jest nowy sposób, według którego otrzymuje się tetrakcyklinę z wydajnością powyżej 90% w odniesieniu do wszystkich substancji czynnych, znajdujących się w podłożu fermentacyjnym przy zastosowaniu normalnych mikroorganizmów. Wynalazek polega na tym, że do podłoża, względnie do poszczególnych jego składników, jak np. mąki sojowej dodaje się albo brom elementarny albo bromowane, nietoksyczne organiczne związki bromu z bromem związanym kowalennie. Jako organiczne związki bromu można stosować np. sól amonową lub sodową kwasu bromometanosulfonowego, czterobromofenolftaleinę itp. w ilości najwyżej 0,5%.

Organiczne związki bromu, które dodaje się jako takie, albo które same tworzą się przez działanie elementarnego bromu w podłożu, przeciwdziałają metabolizmowi chlorków. W obecności organicznych związków bromu w podłożu fermentacyjnym szczepy wytwarzające normalnie chlorotetracyklinę produkują wyłącznie tetracyklinę.

Nowy sposób posiada tę zaletę, że chlorków nie trzeba usuwać. Jest to korzyść nie tylko ze względów ekonomicznych, ponieważ obecność w pewnym określonym minimalnym stężeniu istotnie wpływa na wysoką wydajność.

Zastosowanie elementarnego bromu jest szczególnie korzystne, ponieważ nie wymaga specjalnego zabiegu, poza tym brom jest najtańszym czystym surowcem bromowym, dużo tańszym od czystego bromku sodowego lub potasowego.

P r z y k ł a d I. 1000 litrów podłoża o poniżej podanym składzie zaszczepia się w naczyniu z materiału nierdzewnego zarodnikami szczepu produkcyjnego *Streptomyces*.

Podłoże zawiera:

Sacharozy	4,0%
mąki sojowej	3,0%
węglań wapniowego	0,5%
siarczanu sodowego	0,2%
melasu	0,1%
siarczanu amonowego	0,5%

drożdży piwnych	0,2%	
namoku kukurydzy	0,2%	(substancja sucha)
oleju sojowego	0,2%	

Przed sterylizacją dodano 0,01% bromu i podłoże sterylizowano przez 40 minut w temperaturze 115°C. Rozmnażanie przeprowadzono przy 29°C w ciągu 26 godzin w warunkach jałowych. Napowietrzanie 0,5 objętości powietrza na minutę.

Kulturą tą zaszczepiono 9.000 litrów podłoża o następującym składzie:

Sacharozy	5,0%	
mąki sojowej	4,0%	
siarczanu amonowego	0,5%	
węglań wapniowego	1,0%	
siarczanu sodowego	0,1%	
melasu	0,1%	
odgorzonych drożdży piwnych	0,3%	
namoku kukurydzy	0,1%	(substancja sucha)
oleju sojowego	0,2%	
chlorku kobaltowego	30 g	
bromu	0,1%	

Podłoże sterylizowano przez 40 minut w temperaturze 115°C. Napowietrzanie podczas rozmnażania trwającego 72 godziny wynosiło 0,5 — 0,8 objętości powietrza na minutę, temperatura 28 — 30°C, obroty mieszadła 120/minutę. Wydajność wyniosła 2400 jednostek na cm³, z tego 91% tetracykliny i 9% chlorotetracykliny.

P r z y k ł a d II. Postępuje się jak w przykładzie I z tą różnicą, że zamiast bromu elementarnego do obydwu podłoży, dodaje się mąkę sojową, którą uprzednio zadano 10 kg bromu na 360 kg mąki sojowej w ciągu 2 godzin w temperaturze 50°C w wodnej zawieszynie. Wydajność wynosiła 2200 jednostek/cm³, z tego 89% tetracykliny i 11% chlorotetracykliny.

Przykład III. Rozmnażanie i fermentację przeprowadzono jak w przykładzie I, a elementarny brom zastąpiono mieszaniną nienasyconych tłuszczów z przemysłu tłuszczowego (tran rybi, olej słonecznikowy, olej sojowy, olej lniany, olej z orzeszków ziemnych mniej więcej w takim samym stosunku ilościowym), którą przedtem poddano reakcji z elementarnym bromem. Na 100 kg mieszaniny tłuszczów użyto 10 kg bromu.

Zbromowany tłuszcz rafinowano po reakcji przez wytrząsanie z zalkalizowanym metanolem. Do podłoża dodano 0,2% zbromowanej mieszaniny tłuszczów, a następnie począwszy od 10 godziny dodawano 5 kg na 5 godzin. Wydajność wynosiła 3100 jednostek/cm³, z tego 92% tetracykliny i 8% chlorotetracykliny.

P r z y k ł a d IV. Postępowano jak w przykładzie I, lecz zamiast dodawać brom elementarny do podłoża fermentacyjnego, wprowadzono go w ilości 0,08% do następujących składników:

węglań wapniowego	1,0%
namoku z kukurydzy	0,1%
melasu	0,1%
drożdży	0,3%
wody	10,0%

Mieszaninę gotowano przez 20 minut, a następnie wprowadzono do pozostałych składników podłoża. Wydajność wynosiła 3040 jednostek/cm³, z tego 91% tetracykliny i 9% chlorotetracykliny.

P r z y k ł a d V. W takim samym doświadczeniu podczas pierwszych 45 godzin fermentacji dodaje się zamiast elementarnego bromu wszystkiego 0,1% soli amonowej kwasu bromometanosulfonowego. Wydajność wynosiła 3210 jednostek/cm³, z tego 93% tetracykliny i 7% chlorotetracykliny.

P r z y k ł a d VI. W takim samym doświadczeniu zastosowano 0,05% czterobromo-

ftaleiny. Wydajność wynosiła 3050 jednostek/cm³, z tego 91,5% tetracykliny i 8,5% chlorotetracykliny.

P r z y k ł a d VII. W takim samym doświadczeniu, jak w przykładzie I, do podłoża nie dodano bromu, względnie organicznego związku bromu. Wydajność wynosiła 2520 jednostek/cm³, z tego 91% chlorotetracykliny i 9% tetracykliny.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania tetracykliny przez fermentację odpowiedniego podłoża z kulturą *Streptocymes aureofaciens*, albo *Streptomyces viridifaciens* przy zastosowaniu związków bromu jako antymetabolitów chlorków, znamienny tym, że do samych podłoży fermentacyjnych albo ich składników, jak mąki sojowej albo do mieszaniny składników dodaje się brom w postaci elementarnej albo w postaci organicznych związków bromu, nie działających toksycznie na szczep produkcyjny, jak np. sól kwasu bromometanosulfonowego, czterobromofenoltaleinę albo tym podobne, w ilości najwyżej 0,5%.

Spofa, sdruženi podniku pro
zdravotnickou výrobu

Zastępca: mgr Józef Kamiński
rzecznik patentowy

