

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 163670 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3261/84

(51) Int.Cl.5

C 12 P 21/02
//(C 12 P 21/02,
C 12 R 1:465)

(22) Indleveringsdag: 03 jul 1984

(41) Alm. tilgængelig: 05 jan 1985

(44) Fremlagt: 23 mar 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 04 jul 1983 JP 58/121273

(71) Ansøger: *RHONE-POULENC SANTE; "Les Miroirs", 18 avenue d'Alsace; 92400 Courbevoie, FR

(72) Opfinder: Satoshi *Morioka; JP, Makoto *Shida; JP, Nobuyuki *Suzuki; JP, Kiyoshi *Sekihara; JP

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

(54) Fremgangsmåde til fraskillelse og udvinding af nosiheptid

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag

3261-84

Ved en fremgangsmåde til fraskillelse og udvinding af antibiotiket nosiheptid, hvorved en dyrkningsblanding fremkommet ved dyrkning af nosiheptid-producerende stamme tilhørende slægten Streptomyces blandes med et opløsningsmiddel, en opløsningsmiddel-uopløselig del, der har mycelium som hovedkomponent, fraskilles, og nosiheptid udvindes fra opløsningsmidlet, anvendes der som opløsningsmiddel en cyklisk ether.

Der opnås herved en god fraskillelse af nosiheptid og en god renhed af det udvundne nosiheptid.

LJK 163670 B

Den foreliggende opfindelse angår en særlig fremgangsmåde til fraskillelse og udvinding af nosiheptid, som er et antibiotikum, og opfindelsen angår nærmere bestemt en fremgangsmåde til fraskillelse og udvinding af nosiheptid
5 fra en dyrkningsblanding under anvendelse af særlige opløsningsmidler.

Nosiheptid (betegnet 9671RP) er et antibiotikum fremstillet ud fra stammer, der hører til slægten Streptomyces (jf. JP-offentliggørelsesskrift nr. 880/1965), og er
10 kendt som et foderadditiv til dyr.

Til fremstilling af nosiheptid kendes dyrkningsmetoden, hvorved der anvendes en nosiheptidproducerende stamme tilhørende slægten Streptomyces, men fraskillelsen og udvindingen af nosiheptid fra dyrkningsblandingen er endnu
15 ikke blevet nærmere undersøgt. Generelt gennemføres fraskillelsen og udvindingen af antibiotikum fra dyrkningsblandingen ved blanding af dyrkningsblandingen med et opløsningsmiddel og fraskillelse af myceliet, der er uopløseligt i opløsningsmidlet. Ved denne proces er valget af det rigtige opløsningsmiddel meget vigtigt. Opløsningsmidlet skal have en god evne til at fraskille en opløsningsmiddel-uopløselig del, der har mycelium som hovedbestanddel, og skal have en god opløsende virkning på antibiotiket.

Opløsningsmidlet varierer alt efter myceliet eller antibiotiket, der skal fraskilles. For eksempel kendes en metode med anvendelse af acetone, methanol og ethanol (JP-offentliggørelsesskrift nr. 29157/73) til fraskillelse og udvinding af multhiomycin fra dyrkningsblandingen fremkommet ved dyrkning af en multhiomycinproducerende stamme tilhørende
25 de slægten Streptomyces.

Endvidere kendes en metode med anvendelse af chloroform eller en opløsningsmiddelblanding med chloroform som hovedbestanddel (JP-offentliggørelsesskrift nr. 26718/70) til fraskillelse og udvinding af thiopeptin B fra dyrkningsblandingen fremkommet ved dyrkning af en thiopeptin B-producerende stamme tilhørende slægten Streptomyces. Imidlertid er evnen af sådanne kendte opløsningsmidler til at op
35

løse nosiheptid for lille til, at der opnås en tilstrækkelig effekt.

På baggrund af det ovenfor anførte er det formålet med den foreliggende opfindelse at tilvejebringe en effektiv
5 metode til fraskillelse og udvinding af nosiheptid. Dette formål opfyldes ved en fremgangsmåde til fraskillelse og udvinding af nosiheptid, hvorved en dyrkningsblanding fremkommet ved dyrkning af en nosiheptidproducerende stamme tilhørende slægten *Streptomyces* blandes med et første opløsningsmiddel, hvorefter en uopløselig del, der har mycelium
10 som hovedkomponent, fraskilles, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at det første opløsningsmiddel er en cyklisk ether, og at der efter fraskillelsen af den uopløselige del tilsættes et andet opløsningsmiddel, der er fuldstændig
15 opløseligt i det første opløsningsmiddel, men tungtopløseligt eller uopløseligt i vand, i en mængde på 0,05-0,5 gange volumenet af det første opløsningsmiddel, hvorefter det dannede vandlag fraskilles, og nosiheptidet udvindes fra opløsningen. Opfindelsen beskrives detaljeret i det følgende.

20 *Streptomyces actuosus* (NRRL 2954; ATTC 25421) tilhørende slægten *Streptomyces* eller dens mutanter er kendte som nosiheptidproducerende stammer.

Dyrkningsblandingen indeholdende nosiheptid fås ved at dyrke en sådan stamme ved f.eks. metoden, der er beskrevet i JP-offentliggørelsesskrift nr. 880/1965. Dyrkningsblandingen indeholder kulhydrater, uorganiske salte, der
25 hydrerer fra sammensætningen af fermenteringsmediet, mycelium, nosiheptid og lignende. Nosiheptid akkumuleres på overfladen af dette mycelium, der hovedsagelig er sammensat
30 af actinomyceter, der har en kompliceret overfladestruktur.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen blandes en sådan dyrkningsblanding med en cyklisk ether (i det følgende betegnet "den første opløsningsmiddelbehandling").

Cycliske ethere omfatter tetrahydrofuran, dioxan og
35 lignende, og tetrahydrofuran foretrækkes.

Som dyrkningsblanding, der anvendes ved den første

0 opløsningsmiddelbehandling, anvendes der enten dyrknings-
blanding underkastet en afvandingsbehandling ved hjælp af
en mekanisk anordning, såsom en centrifugalseparator eller
et filter, eller den rå dyrkningsblanding uden afvandings-
5 behandling.

Det er vanskeligt at gennemføre en afvandingsbehand-
ling af dyrkningsblandinger med mycelier, hvis overflade-
struktur er kompliceret, men den cycliske ether, der anven-
des ifølge opfindelsen, har en fremragende opløsende virk-
10 ning på nosiheptid, selv når der anvendes en rå dyrknings-
blanding med et højt fugtighedsindhold. Det er derfor øko-
nomisk fordelagtigt at anvende rå dyrkningsblanding ved gen-
nemførelsen af den første opløsningsmiddelbehandling.

Den anvendte mængde af den cycliske ether, som anven-
15 des derved, afhænger af mængden af vand og nosiheptid i
dyrkningsblandingen, og den vælges generelt til 0,5 til
5 gange, fortrinsvis 1,5 til 2,5 gange volumen af dyrk-
ningsblandingen.

Den første opløsningsmiddelbehandling gennemføres ge-
20 nerelt under anvendelse af en omrøringstank med et udløb
for uopløseligt materiale i bunden. Behandlingstiden er sæd-
vanligvis 0,5-3 timer, fortrinsvis 1-2 timer, og temperatu-
ren er sædvanligvis 5-80°C, fortrinsvis fra stuetempera-
tur til 60°C.

25 pH-værdien af dyrkningsblandingen, der anvendes ved
behandlingen, varierer afhængigt af dyrkningstilstanden.
Det foretrækkes at indstille pH-værdien til 3-10, fortrins-
vis 5-7, ved behandlingen. Denne indstilling forhindrer
nosiheptid i at blive overført til vandlaget og gør udvin-
30 dingsgraden højere, når vandlaget fraskilles til fjernelse
af urenheder, hvilket beskrives nedenfor.

Efter den første opløsningsmiddelbehandling henstil-
les blandingen af dyrkningsblanding og opløsningsmiddel, og
den deles i to dele, hvoraf den ene er en uopløselig del in-
35 deholdende mycelium som hovedbestanddel, og den anden er

klart opløsningsmiddel indeholdende opløst nosiheptid (dette klare opløsningsmiddel indeholder meget vand og betegnes i det følgende "det første behandlings-opløsningsmiddel"). De to dele adskilles ved udledning af det udfældede uopløselige materiale gennem udløbet i bunden af omrørings-
5 tanken.

Den ovenfor anførte behandling er sædvanligvis tilstrækkelig i sig selv, da den cycliske ether anvendt ifølge opfindelsen har en høj evne til opløsning af nosiheptid, men det fraskilte uopløselige materiale kan om fornødent
10 behandles med cyclisk ether igen.

Efter denne behandling tilsættes og iblandes et andet opløsningsmiddel, som er opløseligt i det første behandlings-opløsningsmiddel, men tungtopløseligt eller uopløseligt i
15 vand, i det første behandlingsopløsningsmiddel til dannelse af et lag af vand, som var opløst i det første behandlings-opløsningsmiddel, og derefter fjernes det vandige lag.

Benzen, toluen, xylen, hexan, heptan eller cyclohexan anvendes som vanduopløseligt opløsningsmiddel. Den anvendte
20 mængde varierer afhængigt af mængden af vand i det første behandlingsopløsningsmiddel. Mængden af i vand tungtopløseligt eller uopløseligt opløsningsmiddel er 0,05-0,5 gange, fortrinsvis 0,25-0,35 gange volumen af det første behandlings-opløsningsmiddel. Når mængden af opløsningsmiddel
25 ligger under det ovenfor anførte område, er det ikke muligt at fraskille hele mængden af vand opløst i det første behandlings-opløsningsmiddel, og når denne mængde ligger over dette område, udfældes nosiheptid fra opløsningsmidlet.

Laget af vand, som var opløst i opløsningsmidlet,
30 kan dannes ved anvendelse af den nævnte omrøringsstank, idet man efter fraskillelse af uopløseligt materiale tilsætter vanduopløseligt opløsningsmiddel og blander det i det første behandlings-opløsningsmiddel i omrøringsstanken ved samme temperatur som ved den første opløsningsmiddelbehandling i
35 1-10 minutter.

Ved fraskillelsen af vandlaget fraskilles urenheder,

såsom kulhydrater og uorganiske salte, som var opløst i det første behandlings-opløsningsmiddel, sammen med vandet, og der kan direkte udvindes et højrenset nosiheptid fra opløsningen. På dette stadium vil lidt nosiheptid kunne gå tabt 5 ved overføring til vandlaget, men dette kan forhindres effektivt ved indstilling af pH-værdien af dyrkningsblandingen anvendt ved den første opløsningsmiddelbehandling inden for det ovenfor beskrevne område.

Fra opløsningsmiddelblandingen udvindes nosiheptid 10 enten ved udfældning af dette ved afdestillering af opløsningsmidlet og mekanisk udvinding eller ved udfældning af nosiheptid ved tilsætning af en tredje komponent til opløsningsmiddelblandingen, og det foretrækkes som tredje komponent at anvende det samme opløsningsmiddel som ved fraskillelse af vandlaget. 15

Mængden af opløsningsmiddel (den tredje komponent), der kan anvendes til fraskillelse af nosiheptid, vælges i området 0,2-1,0 gange, fortrinsvis 0,4-0,6 gange volumen af opløsningsmiddelblandingen efter fraskillelse af vandlaget. 20

Behandlingen gennemføres under de samme betingelser som fraskillelsen af vand, dvs. opløsningsmidlet sættes til omrøringstanken efter fraskillelsen af vand.

Udvindingen af nosiheptid, der er udskilt fra opløsningsmiddelblandingen, kan let gennemføres ved hjælp af 25 centrifugalseparation eller filtrering.

Det således udvundne nosiheptid indeholder undertiden en lille mængde tungmetaller, såsom Fe, Co, Ni, Cu og Mn. Hvis det er nødvendigt at fjerne tungmetal, bør nosiheptid 30 opløses i et passende opløsningsmiddel og behandles med aktivt kul, silicagel eller chelat-ionbytterharpiks.

Fraskillelsen af tungmetal kan også foretages fra opløsningsmiddelblandingen efter fraskillelse af vand.

Den foreliggende opfindelse gør det muligt at gennemføre fraskillelsen og udvindingen af nosiheptid fra dyrkningsblandingen på en økonomisk effektiv måde ved anvendelse 35

af særlige opløsningsmidler, hvilket udgør et teknisk frem-
skridt ved fremstilling af nosiheptid.

Den foreliggende opfindelse illustreres i det følgende
eksempel.

5

Eksempel

En blandetank med et udløb i bunden fyldes med 100
volumendele dyrkningsblanding fremkommet ved dyrkning af
Streptomyces actuosus og med 200 volumendele tetrahydrofu-
10 ran, og der blandes under omrøring ved en temperatur på
60°C i 1 time.

Dyrkningsblandingen har følgende sammensætning:

	mycelium	7,5 vægt-%
	kulhydrater	2,0 vægt-%
15	uorganiske salte	0,5 vægt-%
	nosiheptid	0,5 vægt-%
	vand	89,5 vægt-%

og den har en pH-værdi på 5,6.

Der henstilles i 5 minutter til udfældning af uoplø-
20 seligt materiale efter den ovenfor anførte blanding, og der-
efter udledes det uopløselige materiale gennem udløbet. Mæng-
den af uopløseligt materiale er 75 volumendele, og mængden af
det første behandlings-opløsningsmiddel (tetrahydrofuranopløs-
ning) i tanken er 225 volumendele. Resultaterne af en væske-
25 chromatografisk analyse viser, at opløsningsmidlet indehol-
der 2,11 vægt-% nosiheptid (udbytte: 95 vægt-%).

Derefter sættes der 60 volumendele heptan til behol-
deren og blandes i 5 minutter, der henstilles i 10 minutter,
og det dannede nedre vandlag bortledes gennem udløbet (mæng-
30 den af udledt vand er 60 volumendele, og der bliver 225 vo-
lumendele af opløsningsmiddelblandingen tilbage). Graden af
fjernelse af kulhydrater og uorganiske salte med denne ud-
ledning af vand er henholdsvis 95 og 99 vægt-%.

Analyse af hver sammensætning til bestemmelse af den
35 ovenfor anførte fjernelsesgrad gennemføres på følgende måde.

Kulhydrater: Efter tilsætning af vand filtreres op-

løsningsmiddelblandingen til fraskillelse af udfældet nosiheptid, og remanensen, der fås ved destillering og tørring af filtratet, opløses i vand. Efter tilsætning af farverea-genser måles absorbansen.

- 5 Uorganiske salte: Der gennemføres atomabsorptionsana-lyse ved anvendelse af det første behandlings-opløsningsmid-del.

Derefter sættes der igen 100 volumendele heptan til tetrahydrofuranet efter fjernelsen af vandlaget og omrøres
10 i 5 minutter, og hele tankens indhold udledes og føres til en centrifugalseparator, hvorefter nosiheptid udvindes.

Der er kun spor af nosiheptid tilbage i det fraskil-te opløsningsmiddel, og renheden af det udvundne nosiheptid er 95 vægt-% ifølge væskechromatografisk analyse.

15

Referenceeksempel.

Opløseligheden af nosiheptid i dyrkningsblandingen anvendt i eksempel 1 i forskellige opløsningsmidler som an-givet i tabel I er målt og angivet i tabel I.

- 20 Opløseligheden er i overensstemmelse med "ministeriel bestemmelse vedrørende specifikation af foderkomponenter og foderadditiver".

Tabel I

	<u>Opløsningsmiddel</u>	<u>Opløselighed</u>
25	ethanol	meget tungtopløseligt
	isopropanol	tungtopløseligt
	amylalkohol	do.
	toluen	do.
30	chloroform	do.
	dichlormethan	meget tungtopløseligt
	dichlorethan	do.
	ethylacetat	do.
	isobutylacetat	do.
35	acetone	tungtopløseligt
	methylisobutylketon	do.
	tetrahydrofuran	opløseligt

P A T E N T K R A V.

1. Fremgangsmåde til fraskillelse og udvinding af
nosiheptid, hvorved en dyrkningsblanding fremkommet ved
dyrkning af en nosiheptid-producerende stamme tilhørende
5 slægten Streptomyces blandes med et første opløsningsmiddel,
hvorefter en uopløselig del, der har mycelium som hovedkom-
ponent, fraskilles, k e n d e t e g n e t ved, at det første
opløsningsmiddel er en cyclisk ether, og at der efter fra-
skillelsen af den uopløselige del tilsættes et andet opløs-
10 ningsmiddel, der er fuldstændig opløseligt i det første
opløsningsmiddel, men tungtopløseligt eller uopløseligt i
vand, i en mængde på 0,05-0,5 gange volumen af det første
opløsningsmiddel, hvorefter det dannede vandlag fraskilles,
og nosiheptidet udvindes fra opløsningen.

15 2. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g -
n e t ved, at den cycliske ether er tetrahydrofuran.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e -
t e g n e t ved, at volumen af det første opløsningsmiddel
er 0,5-5 gange volumen af dyrkningsblandingen.

20

25

30

35