

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningskrift nr. 121389

Int. Cl. C 12 d 9/18 Kl. 6b-16/03

Patentsøknad nr. 151.869 Inngitt 5.II 1964

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII 1968

Søknaden utlagt og utlegningskrift utgitt 22.II 1971

Prioritet begjært fra: 8.II-63 Storbritannia,
nr. 5263/63

Pierrel S.p.A.,
30 Via Turati, Milano, Italia.

Oppfinnere: Eleuterio Isidori, Via G.C. Falco 9, Capua (Caserta),
Giovanni Aurigemma, Viale Ferrovia 36, Capua
(Caserta) og Gerardo Fabrizio, Viale Augusto 62,
Neapel, Italia.

Fullmektig: Dr. ing. K. O. Berg.

Fremgangsmåte for fremstilling av oksytetracyklin eller salter
derav.

Den foreliggende oppfinnelse angår en fremgangsmåte for fremstilling av oksytetracyklin eller salter derav ved submers, aerob dyrking av en organisme av slekten *Streptomyces* i et næringsmedium som inneholder kullstoff- og nitrogenkilder. Det er oppfinnelsens formål å tilveibringe en slik fremgangsmåte, ved hvilken man utnytter en mikroorganisme som gir spesielt høye utbytter av oksytetracyklin, slik at denne forbindelse vinnes med lavere omkostninger enn hittil. Dette oppnås ifølge oppfinnelsen ved at *Streptomyces capuensis* n. sp. C.B.S. 113.63 dyrkes under submers, aerobe betingelser i et næringsmedium som inneholder en kullstoff- og energikilde, fortrinnsvis i form av kullhydrat, en kompleks organisk nitrogenkilde og hvis ønsket ytterligere et uorganisk ammoniumsalt, et fettstoff av animalsk eller vegetabilsk opprinnelse og mineralske stoffer eller flere av disse grupper stoffer,

121389

hvoretter det dannede oksytetracyklin utvinnes fra næringsmediet og hvis ønsket omdannes til et salt derav.

Oksytetracyklin er et kjent, verdifullt antibiotikum som hører til gruppen av tetracykliner. Det er bredspektret og anvendes særlig i slike tilfeller hvor behandling med andre antibiotika, f.eks. penicilliner, ikke gir tilfredsstillende resultater. Blant kjente organismer som danner oksytetracyklin kan nevnes *Streptomyces rimosus*, *Streptomyces armillatus*, *Streptomyces gilvus*, *Streptomyces MA 590*, *Streptomyces platensis*, *Streptomyces (Actinomyces) varsoviensis* og *Streptomyces vendargensis*. De kjente fremgangsmåter og organismer for fremstilling av dette antibiotikum gir begrensede utbytter, hvilket forklarer dets høye pris. Det har vist seg at den ovenfor nevnte, hittil ukjente art av slekten *Streptomyces*, *Streptomyces capuensis*, som er deponert hos Centraalbureau voor Schimmelcultures i Baarn, Holland, under betegnelsen C.B.S. 113.63, gir utbytte i mediet av oksytetracyklin av hittil ukjent størrelse, nemlig på 12 000 μ /ml (12 kg/m³), mens de høyeste rapporterte utbytter av *Streptomyces rimosus* er 2 500 - 3 000 μ /ml, tilsvarende 2,5 - 3 kg/m³.

Den stamme av *Streptomyces*, STR-1, som opprinnelig ligger til grunn for den foreliggende fremgangsmåte ble opprinnelig funnet ved siktning av jordprøver samlet inn fra alle deler av Italia og noen land i Syd-Amerika. Der fantes mange oksytetracyklin-produserende stammer, men den nevnte STR-1 utmerket seg ved en høy begynnelsekapasitet med hensyn til oksytetracyklinproduksjon. Den ble videreutviklet og rendyrket inntil det fremkom en stabil stamme med ovennevnte produksjonsevne som ble betegnet C11-765, fikk navnet *Streptomyces capuensis nova species* og ble deponert i Baarn som ovenfor angitt. Denne stamme såvel som den opprinnelige stamme STR-1 avviker uttalt fra alle tidligere beskrevne oksytetracyklinproduserende stammer. I det følgende beskrives *Streptomyces capuensis n.sp.* 113 - 63, og det foretas sammenligning med forskjellige andre, særlig oksytetracyklinproduserende *Streptomyces*-arter. I beskrivelsen brukes til dels fargenummereringer i overensstemmelse med Prausers fargeatlas (Zeit. Allgem. Mikrobiol., 4.95, 1964); Prauserbetegnelsene innledes her med bokstavene Pr.

Vekstbeskrivelse på Bennett-agar etter 12 døgns dyrkning ved 28°C: Mediet hadde følgende sammensetning: 10 g glukose, 1 g gjærekstrakt, 1 g oksekjøtt-ekstrakt, 2 g kasein og enzymatisk hydrolysat ("casaminosyrer"), 20 g agar, vann til 1 000 ml, pH 7,3. Hyfebredden 1,5 - 1,8 μ . Sporer ovale, diameter 1,6 μ . Sporeoverflate glatt. Sporekjedene har over 10 sporer pr. sporofor. Sporoforene er lange, åpne spiraler, undertiden i form av haker. Vekst god,

koloniene runde, svakt hevede særlig på midten av kolonien, uten eller med grålig svakt luftmycelium. Vegetativt mycelium brunt; endres fra gult med alderen til dypbrunt til nesten sort (Pr. Oc, 7r). Oppløselig pigment brunt; endres fra gult med alderen til meget mørkt brunt (Pr. 0, 7r).

Vekstegenskaper på et antall substrater. Dyrkningstiden var 40 døgn til bestemmelse av morfologiske karakterer, 21 døgn til bestemmelse av biokjemiske. Dyrkningstemperatur 25 - 28°C. I substratsammensetningen er alltid tilsatt vann til 1 000 ml.

Substrat	Sammensetning	Streptomyces capuensis C.B.S. 113.63
Stivelses - agar, plater	Uorganisk saltholdig stivelsesagar	Rundekolonier, diameter 3-4 mm, svakt hevede på substratet, især i koloniens sentrum. Rand hel, radiale spalter. Meget sparsomt luftmycelium. Intet eller/oppløse- lig spor av pigment. Vegetativt mycelium og bakside fra fargeløst til skittengult. Sporoforer lange, åpne spiraler med ϕ 4 - 6 μ .
Næringsagar, skråkultur	1 g oksekjøtt ekstrakt, 2 g gjærekstrakt, 5g pepton, 5 g NaCl, 15g agar, pH 7,4	Svak vekst. Intet luftmycelium. Lysebrunt vegetativt mycelium. Intet oppløselig pigment. Bakside lysebrun (fra gul til brun)
Czapek- kasein-agar	10 g sakkarose, 5g "Casaminosyrer", 1g K_2HPO_4 , 0,5 g $MgSO_4$, $7H_2O$, 0,5 g KCl, 0,01g $FeSO_4$, pH 7,0 - 7,3	Vegetativt mycelium og bakside fra fargeløs til kremfarget til dyp- brun. (Pr. Oc, 6r). Intet luftmy- celium. Oppløselig pigment fra gult til brunt (lysere enn Pr. Oc, 4r)
Czapek-agar (syntetisk agar)	30 g sakkarose, 2 g $NaNO_3$, 1 g K_2HPO_4 , 0,5 g $MgSO_4$, $7H_2O$, 0,5 g KCl, 0,01 g $FeSO_4$, 15 g agar, pH 7,0 - 7,3	Ingen vekst

forts. av tabell

Substrat	Sammensetning	Streptomyces capuensis C.B.S. 113.63.
Potetglukose- agar, skråkul- tur	200 g skrellete, kokte, mosede poteter, 20 g glukose, 10 g agar, pH 7,4	Riktig god vekst. Intet luftmyce- lium (over 40 døgn gamle kultur- er evt. med spor av grålig luft- mycelium). Vegetativt mycelium og bakside mørkebrune, i unge kul- turer gule, i gamle til nesten sorte (Pr.Oc. 7r). Oppløselig pigment mørkebrunt (mørkere enn Pr.Oc. 6r).
Havremels- agar, skrå- kultur	20 - 65 g valset havre kokt til tynn velling i 1 l vann, filtrert, 18- 20 g agar, pH 7,2	Riktig god vekst. Luftmycelium ytterst svakt eller manglende. Vegetativt mycelium og bakside mørkebrune. Oppløselig pigment mørkebrunt.
Glycerol- asparaginagar	10 g glycerol, 1 g aspar- agin, 1 g K_2HPO_4 , 20 g agar, pH 7,0	Moderat vekst. Praktisk talt intet luftmycelium, grålig. Vegetativt mycelium mørkebrunt. Oppløselig pigment brunt.
Maisstøpevanns- agar	10 g maisstøpevann, 20g sakkarose, 2 g $(NH_4)_2$ HPO_4 , 4 g K_2HPO_4 , 20g agar, pH 6,6 - 6,8	Riktig god vekst. Intet luftmycelium. Vegetativt mycelium brunt. Opp- løselig pigment brunt.
Glukose- asparagin- agar, plater	10 g glukose, 0,5 g asparagin, 0,5 g K_2HPO_4 , 15 g agar pH 6,8	Mer eller mindre runde kolonier med diameter 3 -4 mm, hakket rand og rynket overflate. Tverrsnitt flatt til svakt konvekst. Vegetativt mycelium brunt i midten og beige ved den ytterste periferi. Intet luft- mycelium. Intet oppløselig pigment. Sporoforer av type spira, meget løse spiraler.

forts. av tabell

Substrat	Sammensetning	Streptomyces capuensis C.B.S. 113.63
Gjær-agar, skråkultur	10 g gjærekstrakt, 10g asparagin, 0,5 g K_2HPO_4 15 g agar, pH 6,8	Særdeles god vekst. Luftmyce- lium ytterst sparsomt. Vegeta- tivt mycelium brunt. Oppløse- lig pigment mørkebrunt.
Potet- stykker	Stykker av passende størrelse og form; de- stillert vann tilsettes, som steriliseres	God vekst. Vegetativt myceli- um kornet, ujevnt, dets farge fra beige eller gullig over rød- ligbrun til sort med alderen. Potetstykkene blir sorte. Intet luftmycelium. Oppløselig pig- ment lysebrunt.
Kalsium- malatagar	5 g kalsiummaleat, 0,5 g NH_4Cl , 0,5 g K_2HPO_4 , 18 g agar, pH 7,0	Vekst rimelig. Vegetativt myce- lium og bakside ved begynnelsen fra chamois til brunlig-olivenfar- get, endres med kulturens eldning til sortaktig. Luftmycelium ytterst sparsomt, lerfarget. Oppløselig pigment fra gullig til brunt.
Peptonagar	8,5 NaCl, 1 g gjær- ekstrakt, 1 g trypton, 17 g agar, pH 6,8 -7,0	Vegetativt mycelium fargeløst. Bakside gul, mørkere enn Pr. Co, 4a. Intet luftmycelium. Oppløse- lig pigment i spor.
Tyrosin- medium	5 g pepton, 3 g okse- kjøttekstrakt, 15 g agar, 5 g L-tyrosin, pH 7,0	Vegetativt mycelium og bakside rikelige, fra fargeløse til gullige (Pr. Co, 4b-s). Intet luftmyce- lium. Oppløselig pigment kun i spor.
Xantin- medium	5 g pepton, 3 g okse- kjøttekstrakt, 4 g xan- tin, 15 g agar, pH 7,0	Vegetativt mycelium rikelig, far- geløst. Baksiden omtrent fløte- farget (Pr. C, 7a). Intet luftmyce- lium.

Biokjemiske karakterer

Reduksjon av nitrat til nitrit er positiv på peptonsuppe (sammensetning: 5 g pepton, 3 g oksekjøtttekstrakt, 1 g KNO_3 , vann til 1000 ml, pH 7,4) og negativ på nitratsuppe; dvs. nitratreduksjonen er positiv på organiske og negativ på uorganiske medier.

Streptomyces capuensis har ikke evne til å danne melanin på jernpeptonagar (sammensetning: 15 g pepton, 5 g protein-pepton, 1 g gjærekstrakt, 0,5 g ferriammoniumcitrat, 1 g K_2HPO_4 , 0,08 g natriumtiosulfat, 15 g agar, vann til 1000 ml, pH 6,7) og kan i det hele tatt ikke danne melanin.

Streptomyces capuensis har temperaturoptimum ved 25-30°C, og litt svakere vekst ved 37°C, meget sparsom ved 45°C og ingen ved 50°C. Optimumstemperaturer for pigmentene av substratmycelium er 30°C, ved 37°C er den mindre. Produksjon av oppløselig pigment er best ved 28-30°C, ingen ved 45°C.

Lakmusmelk peptoniseres fullstendig av *Streptomyces capuensis* på 15 dager; lakmusmelken alkaliseres langsomt, på 15 dager. Lakmusmelk koaguleres ikke. På plater kan skummet melk utnyttes fullstendig av organismen.

Gelatinsmeltning skjer i rør hurtig og fullstendig ved 27°C, langsommere og mindre fullstendig ved romtemperatur. På plater utnyttes gelatin fullstendig.

Stivelse hydrolyseres hurtig. Cellulose kan ikke utnyttes.

Virkning på tyrosin; mediet klares i en diameter på 1-1,5 cm. Tvilsom eller ingen virkning overfor xantin.

Streptomyces capuensis danner ikke hydrogensulfid.

Utnyttelse av noen kullstoffkilder

Undersøkelsen skjedde ved hjelp av følgende basalmedium:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,64	g
KH_2PO_4	2,38	g
K_2HPO_4	5,65	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,00	g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0064	g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0011	g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,0079	g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0015	g
Agar	15,00	g
Destillert vann til	1000	ml

Mediet ble regulert til pH 6,8 - 7,0 og anbragt i rør i mengder på 9,5 ml og autoklavert ved 120°C. Etter avkjøling til 45 - 60°C ble tilsatt en steril vandig oppløsning av den til avprøvning værende C-forbindelse til ønsket konsentrasjon, for sukkerartenes vedkommende så den ikke overstiger 1%, for natriumsalter av organiske syrer så den ikke overstiger 2%. Prøven skjedde enten i petriskåler eller på skråkultur i rør; i begge tilfeller ble det stivnede substrat podet med prøveorganismen. Forsøkene ble foretatt minst in duplo. Det ble foretatt negativ kontroll, dvs. dyrkning på basalmediet uten tilsatt kullhydrat, som kullstoffkilde. I nedenstående tabell ses resultatene idet resultatene først gis for den positive og negative kontroll. For de enkelte forbindelsers vedkommende er utnyttelsen angitt for følgende tegn:

- ++ meget positiv utnyttelse, dvs. vekst som er kraftigere enn den positive utnyttelse
- + positiv utnyttelse, dvs. kraftigere vekst enn negativ, men svakere enn positiv kontroll
- + tvilsom utnyttelse, dvs. svakt bedre vekst enn negativ kontroll
- negativ utnyttelse, dvs. vekst omtrent som negativ kontroll
- ingen utnyttelse, dvs. ingen vekst.

Det bemerkes at det ved den positive kontroll angis rikelig vekst uten dannelse av luftmycelium. Med én kullstoffkilde, nemlig l-arabinose, er det rikelig vekst med forholdsvis rikelig luftmycelium til stede; l-arabinose synes å være den eneste kullstoffkilde som kan gi velutviklet luftmycelium. Dyrkningstid 10 dager, dyrkningstemperatur 27°C.

Tabell

Kullstoffkilde	<i>Streptomyces capuensis</i> C. B. S. 113.63
Positiv kontroll	rikelig vekst uten luftmycelium
Negativ kontroll	sparsom vekst uten luftmycelium
l-arabinose	++ (luftmycelium til stede)
d-glukose	++
Sakkarose	-
d-xylose	+
i-inositol	++
d-mannitol	++
d-fruktose	++
l-rhamnose	-
Raffinose	++
Cellulose	--

Celluloseacetat	-
Natriumacetat	+
Natriumcitrat	++
Stivelse	++
Dulcitol	-
Dextrin	++
Glycerol	++
Levulose	++
Laktose	++
Sorbitol	++
Maltose	++
d(+)-mannose	++
d-trehalose	++
Inulin	+
Adonitol	++
Na-succinat	++
Eskulin	++
Salicin	+
α -metylglukosid	+

I det av Baldacci oppstilte taxonomiske system (Giornale de Microbiologia 1958) henføres *Streptomyces capuensis* til seksjon II, underseksjon B, serie Antibioticus.

I det av Pridham, Hesseltine og Benedict (Applied Microbiology, 1958, 52. - 79) henføres *Streptomyces capuensis* til seksjon Spira, gråserie.

I den av Waksman oppstilte nøkkel (The Actinomycetes, vol. 2 (1961) side 155 - 164) volder plasseringen vanskelighet. Arten hører hjemme i hovedgruppe A, men kan ikke med sikkerhet plasseres i dennes grupper I eller II, hvor alternativene er om proteinholdige medier ikke pigmenteres dypbrune eller sorte og arten er melaninnegativ; eller om proteinholdige medier pigmenteres mørkt og arten er melaninpositiv. Kombinasjonen mørk pigmentering og melaninnegativ, som finnes hos *Streptomyces Capuensis*, er ikke tatt i betraktning. Hvis arten plasseres i A II, må den anbringes i gruppe 7 eller 9; hvis den plasseres i A I, i gruppe 7. Likelædes er det vanskelig å plasere *Streptomyces capuensis* i det taxonimiske system i samme boks kapitel 6, side 117 - 151. På basis av flertallet av artens egenskaper vil man plasere den i serien Flavus, men legges den brune pigmentering på proteinmedier til grunn, må arten plasseres i serie Hygroscopicus.

De nærmeststående arter i Baldaccis system er *Streptomyces antibioticus*, som i motsetning til *Streptomyces capuensis*, normalt har sporoforer av

typen *rectus*, vokser og danner luftmycelium og oppløselig pigment på Czapek-agar, danner oppløselig pigment på gelatin og melk, danner H_2S , har positiv melaninreaksjon og negativ tyrosinreaksjon; *Streptomyces fumosus* som har sporoforer av typen *rectus*, vokser og danner luftmycelium og oppløselig pigment på Czapek-agar og danner mørkebrunt pigment i melk; *Streptomyces cylindrosporus* som har sporoforer av typen *rectus*, som regel har velutviklet luftmycelium, smelter gelatin langsomt (10 - 15 dager), danner mørkebrunt til sort pigment i melk og hydrolyserer stivelse svakt; *Streptomyces fimbriatus* som bl.a. avviker fra *Streptomyces capuensis* ved som regel å ha rikelig, hvitt til grått luftmycelium på Czapek-agar, fløtefarget oppløselig pigment, langsom gelatinsmeltning og ingen koagulering av melk; *Streptomyces chromofuscus* som vokser og danner luftmycelium på Czapek-agar, ikke reduserer nitrat og kun hydrolyserer stivelse svakt; *Streptomyces cacaoi* som vokser og danner luftmycelium på Czapek-agar, danner luftmycelium på potetagar og reduserer nitrat svakt; *Streptomyces niger* som danner luftmycelium på potetagar og Czapek-agar, ikke virker på melk eller stivelsesagar, ikke reduserer nitrat og gir svak gelatin-smeltning.

I Pridham et al's system er de nærmeststående arter *Streptomyces antibioticus*, *cacaoi* og *chromofuscus* bl.a. de ovennevnte samt *Streptomyces filipinensis* som vokser og danner luftmycelium og oppløselig pigment på Czapek-agar, som regel har brungult eller lysegult vegetativt mycelium og reduserer nitrat svakt; *Streptomyces hygroscopicus* som vokser og danner svakt luftmycelium og oppløselig pigment på Czapek-agar, smelter gelatin langsomt og ikke kjennes med mørkebrunt vegetativt mycelium; *Streptomyces olivochromogenes* som vokser og danner luftmycelium på Czapek-agar, har hvitt luftmycelium på næringsagar, danner mørkebrunt til mørkt olivengrønt pigment på gelatinmedier og kan invertere sakkarose! og *Streptomyces platensis* som danner mørkt olivenfarget vegetativt mycelium med totter av grått, hvitt og sort luftmycelium på Czapek-agar, ikke reagerer på melk og kan utnytte cellulose.

Av de ovenfor anførte grunner er utpekning av de nærmeststående arter i Waksman nøkkel og taxonomiske system vanskeligere. I nøklens gruppe A II, 7 finnes *Streptomyces gracilis* med grått til mørkt olivenfarget, *globosus* med mørkegrått, *cylindrosporus* med hvitt og *griseoviridis* med brunt luftmycelium, alle melaninpositive. *Streptomyces globosus* har sporoforer av type *rectus-flexibilis*. *Streptomyces gracilis* vokser på Czapek-agar og har vinrødt vegetativt mycelium. *Streptomyces cylindrosporus* har like sporoforer. I nøklens gruppe A II, 9 finnes fire arter med orange til orangerød vekst på poteter og dermed helt avvikelse fra *Streptomyces capuensis*, og to med hvitt luftmycelium på Czapek-agar, hvor *Streptomyces capuensis* ikke vokser! samt *Streptomyces noboritoensis* som har langt, bølget luftmycelium og ikke danner regulære spiraler.

Også disse er alle melaninpositive. I nøklens gruppe A I, 7 finnes et par arter med koralrødt, gult og gulbrunt vegetativt mycelium, den ovenfor nevnte *Streptomyces niger* samt *Streptomyces althioticus*, som bl. a. avviker fra *Streptomyces capuensis* ved å vokse og danne luftmycelium på Czapek-agar og ved ikke å smelte gelatin.

Til serien *Hygroscopicus* henfører Waksman bl. a. *Streptomyces endus*, *limosus*, *nigrificans*, *violaceoniger*, *hygroscopicus* og *platensis*, av hvilke de to siste er nevnt foran, *Streptomyces limosus* har en om *Nocardia* minnende morfologi og de andre vokser på Czapek-agar, Til serien *Flavus* henfører Waksman adskillige arter, bl. a. *Streptomyces flavus*, *griseoflavus*, *aureofaciens*, *rimosus*, *viridans* og *armillatus*.

På grunn av vanskelighetene ved å avgjøre hvilke arter som skal anses for nærbeslektet med *Streptomyces capuensis*, foretas i det følgende en sammenligning mellom denne, slektens typeart *Streptomyces albus* og et par oksytetracyklinproduserende arter, nemlig *Streptomyces platensis* og *rimosus*.

Karakter	S. albus	S. Rimosus NRRL 2234	S. Platensis	S. capuensis CBS 113-63
Hyfebredde.	1,3-1,7 μ .		1,6 - 2 μ .	1,5-1,8 μ .
Form og ϕ av sporer.	Ovale, 1 μ .	Korte Sylindre.	Ovale, 1,6 μ .	Ovale, 1,6 μ .
Antall sporer i kjede.	1 - 2	Adskillige.	1-2, enkelte korte kjeder.	Over 10.
Sporoforer.	Lange åpne spiraler.	Tallrike spiraler	Spiraler	Lange åpne spi- raler, underti- den haker.
Koloniform.		Flat.		Hevet på midten.
Koloni.	Ingen rev- nedannelse.	Kraketert.		Undertiden radi- ale fissurer.
Kolonirand.		Ujevn		Som regel jevn, hel.

Karakter	S. albus	S. rimosus NRRL 2234	S. platensis	S. capuensis CBS. 113-63
LM-mengde	Rikelig.	Sparsom.	Oftest rikelig.	Oftest intet, synes kun dannet i vesentlig grad på arabinoseholdig medium.
LM's farge.	Hvit.	Grålig, ikke ren hvit.	Forskjellige mørke farger.	Grå.
Vekst på Czapek-agar.	Rikelig, utbredt.	Ingen.	Rikelig.	Ingen.
Potet-glukose-agar.		Moderat VE, gulbrunlig VM, hvitlig LM og sporer, meget svakt, gult OP.	Kraftig VE, VM hvitt til lyst musegrått, velutviklet LM og sporer, brunt OP.	Riktig god VE, VM mørkebrunt, intet LM, meget svakt, ganske lysebrunt OP.
Havremels-agar.		Moderat VE, VM gullig, LM hvitlig, OP gullig, meget svakt.		Riktig god VE, VM mørkebrunt, LM ytterst svakt, OP brunt.
Bennetts agar.		Moderat VE, VM gullig, LM hvitlig, OP gullig.		Riktig god vekst, VM brunt, Intet LM, OP brunt.
Maisstøpevann-agar.		LM hvitlig.		Intet LM.
Stivelsesagar-plater.	LM meget utviklet, hvitt, hurtig hydrolyse i noen,	LM hvitlig, svak hydrolyse.	LM meget velutviklet, god hydrolyse.	Intet LM, kraftig hydrolyse.

121389

Karakter	S. albus	S. rimosus NRRL 2234	S. platensis	S. capuensis CBS. 113-63
	ingen i andre tilfeller.			
Glukose-asparagin-plater.		Runde kolonier, ϕ 3-4 mm, uregelmessig rand, flat overflate, LM hvitlig, sporoforer av type spira, riktig tette spiraler (proptrekkere), OP meget svakt, gullig.	Kolonier med ϕ 3-6 mm, mindre kolonier er flate, evt. svakt hevede og konsentrisk ringede, større kolonier umbonate m. radiale fissurer, LM moderat, mosaikk av hvitt, grått og sort, sporoforer tette og åpne spiraler, OP svakt brunt eller manglende.	Runde kolonier, ϕ 3-4 mm, spaltet rand m. rynket overflate, flat til svakt hevet, intet LM, sporoforer av type spira, meget åpne spiraler, intet OP.
Potetstykker.	Kraftig VE, VM fløtefarvet, LM hvitt.	God VE, LM hvitlig, VM okeraktig gulbrunt, svakt gulligbrunt OP.		God VE, intet LM, OP lysebrunt.
Gelatin-smeltning.	Høy grad.	Svak til moderat.	Meget langsom, begynner etter 12 dager, ufullstendig etter 30.	Hurtig, fullstendig eller nesten fullstendig.
Lakmusmelk.	Koagulering fulgt av peptonisering.	Koagulering, ingen hydrolyse eller peptonisering.	Ingen koagulering eller hydrolyse på 14 dager, deretter	Ingen koagulering, peptonisering på 15 dager, langsom alkali-

Karakter	S. albus	S. rimosus NRRL 2234	S. platensis	S. capuensis CBS. 113-63
		ing, svak alkalinise- ring ved 37°C, ingen ved 28°C.	svak koaguler- ing og pepton- isering; svak alkalisering.	sering.
Nitrat.		Reduseres på organisk, ikke på uorga- nisk medium.		Reduseres på organisk, ikke på uorganisk medium.
H ₂ S.		Dannes ikke.		Dannes ikke.
Kromogeni- sitet.		OP fra gult til lysebrunt på en rekke me- dier, VM van- ligvis farge- løst til gullig.	svakt brunt, VM brunlig eller gulig.	OP fra brunt til mørkebrunt på samme rekke medier, VM van- ligvis mørkebrunt til sort.
Utnyttelse av C-kilder				
l-arabinose	+	++	+	++
l-rhamnose	-	-	+	-
d-xylose	++	+	+	+
d-glukose	++	++	++	++
d-fruktose		++		++
Levulose	+	++		++
Sakkarose		-		-
Laktose		++		++
Raffinose		++		++
Dextrin		++		++
Dulcitol		+		-
Glycerol		++		++
i-inositol		++		++
Cellulose- acetat	+			-

Utnyttelse av C-kilder	S. albus	S. rimosus NRRL 2234	S. platensis	S. capuensis CBS. 113-63
Natrium- acetat	++	++	++	+
Natrium- citrat	++	++	++	++

I foranstående tabell er substratene som de foran beskrevne, kullstoffkilde-forsøsteknikken den beskrevne, signaturene for denne de foran beskrevne. Følgende forkortelser er dessuten brukt: VE = vekst, VM = vegetativt mycelium, LM = luftmycelium og OP = oppløselig pigment.

I det følgende nevnes kort og summarisk de forskjellige karakterer med hensyn til hvilke andre oksytetracyklinproduserende stammer og arter av slekten avviker fra og eventuelt ligner *Streptomyces capuensis*. *Streptomyces* MA 590 danner ikke spiraler; *Streptomyces albofaciens* har sporoforer av type monovercillatus-spira, mens *Streptomyces* sp. 942, armillatur og utilis lik som *capuensis* har spiraler. Mens *Streptomyces capuensis* generelt har mørke farger og ikke danner luftmycelium, har *Streptomyces varsoviensis* som regel fargeløst eller lyst vegetativt mycelium, hvitt luftmycelium og intet oppløselig pigment. *Streptomyces vendargensis* har som regel gullig eller brunlig vegetativt mycelium, hvitt luftmycelium og intet oppløselig pigment. *Streptomyces* sp. 942 har gullig til grålig vegetativt mycelium, hvitt til gullig-grålig luftmycelium og intet oppløselig pigment. *Streptomyces armillatus* har vanligvis gullig til grått vegetativt mycelium, hvitt luftmycelium og intet eller ganske lyst lyserødt til lysebrunt oppløselig pigment. *Streptomyces utilis* har som regel lyserødt vegetativt mycelium, hvitt luftmycelium og intet oppløselig pigment. Hos *Streptomyces albofaciens* er det vegetative mycelium som regel lyst fløtefarget til lysegult, luftmyceliet hvitt og oppløselig pigment dannes som regel ikke. *Streptomyces* MA 590 har alment fra brunt til mørkebrunt vegetativt mycelium, lysegrått til mørkegrått luftmycelium og mørkebrunt oppløselig pigment, som dog mangler på noen medier; arten har som nevnt ingen spiraler og heller ikke ses haker blant sporoforene. *Streptomyces gilvus* har gullig til gråligbrunt vegetativt mycelium, undertiden med mørkebrun bakside, hvitt luftmycelium og svakt gullig oppløselig

pigment. Arten vokser i motsetning til *Streptomyces capuensis* på syntetisk agar (Czapek-agar).

Streptomyces capuensis n. sp. CBS 113.63 avviker således klart fra alle hittil kjente arter, herunder de oksytetracyklinproduserende arter av slekten *Streptomyces*.

Streptomyces capensis' produksjon av oksytetracyklin er meget høy, vanligvis 10000 - 12000 μ /ml eller til og med opp til 17000 μ /ml i dyrkningsmediet. Det har vist seg at et lite innhold av animalsk eller vegetabilsk fettstoff i dyrkningsmediet er av betydning for oppnåelse av høyt utbytte. Det har dessuten vist seg at det er av betydning for høyt utbytte å pøde produksjonsmediet med en ung kultur, og ifølge oppfinnelsen kan man derfor med særlig fordel til innpodning av organismen i det til produksjon bestemte næringsmedium bruke en ung kultur dannet ved dyrkning av et spesielt medium 8 - 10 timer. Endelig har det vist seg at det oppnås spesielt høyt utbytte av oksytetracyklin, såfremt man ifølge oppfinnelsen i næringsmediet som en del av nitrogenkilden bruker ammoniumsulfat og setter to tredjedeler av ammoniumsulfatmengden til dette medium innen dets sterilisasjon og dyrkningens begynnelse og resten etter 40 - 80 timers dyrkning.

Selve fremgangsmåten og dyrkningsteknikken, herunder det nettopp anførte, skal forklares noe mer utførlig i det følgende.

Den beskrevne stamme av *Streptomyces capuensis* nova species frembringer oksytetracyklin i høyt utbytte ved submers dyrkning i vanlige medier sammensatt av kullhydrater, nitrogenkilder og salt. De høyeste utbytter oppnås imidlertid med en spesielt utviklet teknikk.

Stammen holdes i frysetørret tilstand. Subkulturen dannes på agar-skråkultur med følgende sammensetning:

Gjærekstrakt	0,4 g
Maltekstrakt	1,0 g
Glukose	0,4 g
Agar	2,0 g
Demineralisert vann inntil	100 ml

Den vegetative vekst som er nødvendig til podning av produksjonskulturen oppnås på følgende medium:

Nitrogenkilde (sojabønne- det som Distillers Solubles kjente produkt; maisstøpevann)	1,5 - 5,0 g
Kullhydrater (sukkarose; dextrin; stivelse)	2,0 - 3,0 g

121389

Ammoniumsulfat	0,1 - 0,25 g
Kalsiumkarbonat	0,5 - 0,8 g
Svinefettolje	0,1 - 0,25 g
Vann inntil	100 ml

Mediets pH-verdi holdes nøytral og sterilisasjon utføres ved et trykk på $1,05 \text{ kg/cm}^2$. Inkubasjonstemperaturen holdes mellom 25 og 35°C , fortrinnsvis ved $28 - 30^\circ\text{C}$ og inkubasjonen varer fra 10 til 24 timer.

Det er konstatert en betydningsfull faktor som bestemmer oppnåelsen av høye utbytter under de her beskrevne betingelser, nemlig at den vegetative vekstkultur er meget ung, og mer presist uttrykt bør inkubasjonstiden være 8 - 10 timer. I nedenstående oversikt vises resultatene av noen forsøk:

Inkubasjonstid for den vegetative vekst, timer	Utbytte i γ/ml , oppnådd i produksjons- mediet
4	4250
6	6800
8	9850
10	9250
15	7500
24	3700

Det dyrkningsmedium som brukes ved selve produksjonen av oksytetracyclin fremstilles hensiktsmessig i overensstemmelse med det i nedenstående tabell angitte:

Nitrogenkilde (bomullsfrømel eller maisstøpevann)	2,0 - 3,0 %
Kullstoffkilde: a) dextrin, stivelse	5,0 - 7,0 %
b) svinefettolje	2,0 - 3,0 %
Ammoniumsulfat	0,6 - 1,0 %
Ammoniumklorid	0,15-0,25%
Kalsiumkarbonat	0,5 - 1,0 %
Mangansulfat	0,005-0,01%
Koboltklorid	0,0005-0,001%
Vann inntil	100 %

pH-verdien holdes nøytral og sterilisasjon utføres ved $1,055 \text{ kg/cm}^2$. Inkubasjonstiden er 120 - 180 timer, fortrinnsvis 140 timer, og temperaturen holdes på $28 - 30^\circ\text{C}$.

I det følgende gis en oversikt over resultatene ved anvendelse av den beskrevne produksjonskultur.

Dyrknings- tid, timer	pH	Myceliets sedi- mentasjonsvolum	Kullhydrat- innhold	Oksytetracyklin γ/ml
0	7,5	-	62,3	-
15	7,2	8	44,0	-
24	7,2	12	-	-
39	6,5	25	32,0	600
47	6,2	35	-	-
63	6,1	39	16,0	2000
71	6,1	40	-	2800
86	6,0	40	6,0	4500
110	6,0	40	3,0	7500
134	6,0	40	2,0	8700
158	6,1	37	0,0	10000
182	6,3	37	0,0	11100
190	6,4	37	-	12600

Ved forsøkene har det ennvidere vist seg at et annet forhold er av betydning for oppnåelsen av høye utbytter av oksytetracyklin under de angitte betingelser, nemlig at hele mengden av ammoniumsulfat (nitrogenkilde og vekstfaktor) ikke bør settes til dyrkningsmediet fra begynnelsen.

De beste resultater oppnås hvis to tredjedeler av den samlede mengde tilsettes fra begynnelsen og resten under gjæringen etter en dyrkningstid på omkring 40 - 80 timer.

Det er viktig å følge denne teknikk hvis man ønsker å oppnå så gode resultater som nevnt ovenfor:

Oksytetracyklin-utbytte oppnådd uten tilsetning av ammoniumsulfat, ved 40 - 80 timers dyrkning

5660 γ/ml

Do. oppnådd når mediet inneholder hele mengden av ammoniumsulfat fra dyrkningens begynnelse

8750 "

Do. oppnådd når 2/3 av ammoniumsulfatmengden er tilsatt mediet ved begynnelsen og 1/3 ved 40 - 80 timers dyrkning

11250 "

121389

Utvinnelsen av det aktive oksytetracyklin kan skje på forskjellige kjente måter. Det skal bemerkes at noen av de kjente fremgangsmåter kan være uanvendelige ved bruk av den foreliggende stamme og gjæringsmetode.

Tetracyklinene, herunder oksytetracyklin, er uoppløselig ved pH-verdier på 4-7 i vandig oppløsning. I det gjærede substrat er oksytetracyklingen bundet til proteinmolekylene og disse kompleksmolekyler er uoppløselige ved alkalisk pH-verdi. Denne spesielle egenskap kan utnyttes til utvinning av det aktive stoff fra det gjærede substrat. Metoden har inntil nå ikke vært anvendt fordi lavere utbytter ved gjæringen har ført til lave konsentrasjoner av det antibiotiske stoff i det filtrerte substrat, og utfelling ved en pH-verdi på 6 - 9 ikke har vært lønnsomt. Ved lave konsentrasjoner er utfellingen vanskelig og ikke fullstendig, fraskillelsen av det utfelte produkt er tidsrøvende på grunn av suspensjonens høye viskositet ved denne pH-verdi og bunnfallets meget fine partikler.

Dessuten inneholder modervæsken stadig mengder av ikke uanselig størrelse av det antibiotiske stoff, hvilket fører til lave utbytter ved denne operasjon.

Den angitte metode er imidlertid mulig i tilslutning til den her beskrevne organisme og gjæringsmåte, hvor det oppnås høye konsentrasjoner av det antibiotiske stoff; utvinningen kan således skje ved simpel felling ved at substratets pH-verdi innstilles på en verdi på 6 - 9 ved hjelp av en alkalisk oppløsning.

Det gjærede substrat som inneholder 10 000 - 12 000 μ /ml oksytetracyklin ansyres med en mineralsyre, fortrinnsvis HCl eller H_2SO_4 , til en pH-verdi på 2,0 og filtreres. Det klare filtrerte substrat, som inneholder omkring 7 000 - 10 000 μ /ml oksytetracyklin, innstilles langsomt på en pH-verdi på 6 - 9, fortrinnsvis 7,5 - 8,0, ved tilsetning av en alkalisk oppløsning som f.eks. natriumhydroksyd eller ammoniakkvann. Ved denne pH-verdi utfelles oksytetracyklingen rikelig og skilles fra ved filtrering.

Modervæsken inneholder 500 - 600 μ /ml tilbakeværende stoff, hvilket representerer mindre enn 5% av den opprinnelige konsentrasjon.

Bunnfallet tørres i en varmluftstørrer eller vakuumbørrer. Det på denne måte vundne konsentrat inneholder 40% oksytetracyklin, og utbyttet ved operasjonen er ca. 85%.

Resning av produktet og dermed tilveiebringelse av rent oksytetracyklin kan utføres ved en av de kjente metoder som er beskrevet i litteraturen.

Erkjennelsen av de betingelser, under hvilke oksytetracyklingen kan vinnes direkte ved felling fra det filtrerte substrat er betydningsfull, særlig av følgende grunner:

Det er mulig å utvinne oksytetracyklinet fra substratet med meget lave omkostninger.

Det er ikke nødvendig å bruke spesielle oppløsningsmidler til utvinning av oksytetracyklinet fra det filtrerte substrat.

Det er ikke nødvendig å bruke spesielle kompleksdannende stoffer til utvinning av oksytetracyklinet fra det filtrerte substrat.

Utvinning av oksytetracyklin fra et dyrkningsmedium på den her beskrevne måte kan kun gjennomføres i forbindelse med anvendelse av en organisme der som de beskrevne gir høy konsentrasjon av oksytetracyklin i mediet. *Streptomyces capuensis nova* spesies CBS 113.63 er en slik høyt ytende art.

Noen utførelseseksempler tjener til nærmere belysning av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

Eksempel 1

En frysetørret kultur av *Streptomyces capuensis nov. spec.* CBS 113.63 overføres til en agar-skråkultur av den foran angitte sammensetning. Kulturen dyrkes ved 26°C i 12 dager. En kultur vaskes med sterilt destillert vann og suspenderes i et endelig volum på 5 ml.

Denne suspensjon brukes til å pøde 2-liters dyrkningskolber inneholdende 400 ml av følgende sterile medium:

Maisstøpevann (50% fast stoff)	10,0 g
Sakkarose	20,0 g
Ammoniumsulfat	2,0 g
Kalsiumkarbonat	5,0 g
Vann inntil	1000 ml

Kulturen omrøres på en frem- og tilbakegående ryster ved 27°C i 24 timer. Denne kultur brukes til podning av nedenstående næringsmedium til produksjon av oksytetracyklin:

Stivelse	50,0 g
Maisstøpevann (50% fast stoff)	40,0 g
Ammoniumsulfat	5,0 g
Kalsiumkarbonat	7,0 g
Ammoniumklorid	1,5 g
Koboltklorid	0,005 g
Svinefettolje	5,0 g
Vann inntil	1000 ml

121389

Mediet anbringes i 500 ml store Erlenmeyerkolber i en mengde på 50 ml pr. kolbe og steriliseres ved 120°C i 30 minutter. De podede kulturer rystes på en roterende ryster i ca. 6 dager ved en konstant temperatur på 28°C.

Omkring 60 - 80 timer etter podningen settes det til hver kolbe en steril 10% 's vandig oppløsning av ammoniumsulfat i en slik mengde at det i hver kolbe innføres ytterligere 0,125 g ammoniumsulfat.

Etter 140 timer høstes de utgjærede kulturer, substratet ansyres til en pH-verdi på 2,0 med saltsyre og filtreres.

1000 ml filtrert substrat som inneholder ca. 8,5 g oksytetracyklin-aktivitet reguleres langsomt til en pH-verdi på 7,5 med en 25% 's natriumhydroksyd-oppløsning. Oksytetracyklinet utfelles i form av et tynt, viskøst bunnfall; det settes 10 g filterhjelp til suspensjonen, og det hele filtreres.

Filtratet som inneholder 450 μ /ml, representerende ca. 5 % av det samlede aktive materiale, kasseres.

Filterkaken samles opp og tørres under vakuum inntil den inneholder under 2 % vann.

Det på denne måte vundne oksytetracyklin har en renhet på 60 - 70 %, men det således vundne produkt, som tidligere er blandet med filterhjelpen, har en styrke på 350 - 400 μ /ml.

Produktet kan lett renses ved kjente metoder som f.eks. oppløsning og krystallisasjon fra ansyret metanol.

Eksempel 2

Fire kulturer, vunnet som beskrevet i eksempel 1, i 2-liters dyrkningskolber, brukes til podning av podetanker med en arbeidskapasitet på 1000 liter, hvori er anbragt følgende sterile dyrkningsmedium:

Stivelse	20,0 g
Maisstøpevann (50% fast stoff)	30,0 g
Ammoniumsulfat	3,0 g
Kalsiumkarbonat	5,0 g
Svinefettolje	1,0 g
Vann inntil	1000 ml

Podetanken inkuberes ved 27°C i 8 timer. Denne kultur brukes til podning av gjæringstanker hvori det finnes et sterilt produksjonsmedium med følgende sammensetning:

Stivelse	40,0 g
Maisstøpevann (50% fast stoff)	40,0 g
Ammoniumsulfat	5,0 g
Kalsiumkarbonat	9,0 g
Ammoniumklorid	1,0 g
Koboltklorid	0,005g
Svinfettolje	10,0 g
Vann inntil	1000 ml

Kulturen gjæres i 140 timer under sterile betingelser ved en temperatur på 28°C og en luftningshastighet på 0,5 volum luft pr. volum medium. Kulturen røres om kontinuerlig og kontrolleres med hensyn til kullhydratinhold, pH-verdi, veksthastighet og oksytetracyklinstyrke.

Etter omkring 60 - 80 timers gjæring settes en ytterligere mengde ammoniumsulfat til kulturen. En 10% 's vandig oppløsning av ammoniumsulfat steriliseres og settes til kulturen under aseptiske betingelser. Den totale mengde tilsatt ammoniumsulfat på dette tidspunkt bør svare til 2,5 g pr. liter medium.

Etter 130 - 160 timers gjæring har oksytetracyklin-konsentrasjonen en verdi på 10 000 - 11 000 μ /ml eller 10 - 11 kg/m³ substrat.

En gjæringstank med en arbeidskapasitet på 20 m³ gir således 200 - 220 kg oksytetracyklin.

Det gjærede substrat ansyres med saltsyre til en pH-verdi på 2,0, filterhjelpen tilsettes og deretter filtreres til fullstendig klarhet. Det filtrerte substrats pH-verdi reguleres deretter langsomt til en pH-verdi på 8,0 med en 25% 's natriumhydroksyd-oppløsning. Det tilsettes 100 kg filterhjelp og blandingen filtreres på et roterende trommelfilter. Det filtrerte substrat kasseres og filterkaken samles opp og tørres i et tørreapparat til et vanninnhold på under 2 %.

Det vinnes 400 kg tørret produkt inneholdende 100 kg filterhjelp og 300 kg oksytetracyklin med en renhet på 60 %. Utbyttet ved denne delprosess er ca. 85 %.

Det rene hydroklorid av den rene base kan oppnås ut fra dette produkt på i og for seg kjent måte, f. eks. oppløsning i og krystallisasjon fra ansyret metanol, eller oppløsning i alkalisk n-butanol, ekstraksjon i ansyret vann og felling av basen ved nøytral pH-verdi.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av oksytetracyklin eller salter derav

121389

ved submers, aerob dyrkning av en organisme av slekten *Streptomyces* i et næringsmedium som inneholder kullstoff- og nitrogenkilder, karakterisert ved at *Streptomyces capuensis* nova species CBS 113.63 dyrkes under submerse, aerobe betingelser i et næringsmedium som inneholder en kullstoff- og energikilde, fortrinnsvis i form av kullhydrat, en kompleks organisk nitrogenkilde og om ønsket ytterligere et uorganisk ammoniums salt, et fettstoff av animalsk eller vegetabilsk opprinnelse og mineralske stoffer eller flere av disse grupper stoffer, hvoretter det dannede oksytetracyklin utvinnes fra næringsmediet, og om ønsket omdannes til et salt derav.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at det til innpodning av organismen i det til produksjon bestemte næringsmedium brukes en ung kultur dannet ved dyrkning i et spesielt medium 8 - 10 timer.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at det i næringsmediet som en del av nitrogenkilden anvendes ammoniumsulfat og at to tredjedeler av ammoniumsulfatmengden settes til dette medium innen dets sterilisasjon og dyrkningens begynnelse og resten tilsettes etter 40 - 80 timers dyrkning.

Anførte publikasjoner:
