

NORGE



**STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN**

Utlegningssskrift nr. 118708

Int. Cl. C 07 c 103/52 Kl. 12q-6/01
C 12 d 9/20 6b-16/03

Patentsøknad nr. 159.923 Inngitt 1.X 1965

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII 1968

Søknaden utlagt og utlegningsskrift utgitt 2.II 1970

Prioritet begjært fra: 6.X-64 Tsjekkoslovakia,
nr. 5530/64

SPOFA, spojené podniky pro zdravotnickou výrobu,
Husinecká 11a, Praha, Tsjekkoslovakia.

Oppfinnere: Miloslav Vondráček, Petřiny Nr. 1771, Praha 6,
Břevnov, Eva Toscaniová, Podbabská Nr. 4, Praha 6,
Dejvice og Josef Hoffmann, Blahňkova Nr. 3, Praha, Žižkov,
Tsjekkoslovakia.

Fullmektig: Siv.ing. Erling Quande.

Fremgangsmåte ved fremstilling av nye, antibiotisk aktive,
stabile og i vann tungt oppløselige bacitracinforbindelser.

Oppfinnelsen angår en fremgangsmåte ved fremstilling
av nye, i vann tungt oppløselige bacitracinforbindelser som er bio-
logisk aktive, og som er egnet for forskjellige anvendelser, og
som samtidig utmerker sig ved god stabilitet.

Som bekjent er bacitracin et antibiotikum med karak-
ter av et polypeptid, som produseres av mikroorganismene *Bacillus*
subtilis og *Bacillus licheniformis*. Også industriell fremstilling
av bacitracin kan skje ved dyrkning av disse mikroorganismer. Den
i vann lett oppløselige form av bacitracin er forholdsmessig lite
stabil og mister sin biologiske aktivitet, jfr. Lo.C. Craig et al.,
J.Biol.Chem. 199, 259, (1952). Av denne grunn overføres bacitracin
i forskjellige salter som er lite oppløselige i vann, og som er
meget mere stabile. Av disse salter anvendes hyppigst lite oppløse-

lige komplekse tungmetallsalter, US patenter 3.025.216, 2.985.553 og 2.985.534, hvorav den best kjente er det komplekse zinksalt, US patenter 2.809.892, 2.834.711 og 2.803.584. Disse salter er imidlertid fremdeles så vannoppløselige at de ikke kan utvinnes ved direkte utfeldning av fortynnede oppløsninger, f.eks. fra fermenterte næringsmedier. Ved en økonomisk fremstillingsmåte av disse salter er det derfor nødvendig at det fermenterte næringsmedium først renses og derpå konsentreres.

Fra litteraturen (J.T. Garbutt, A.L. Morehouse og A.M. Hansen i J.Agr. and Food Chem. 9 (1961), 285, J.M. Grass i Drug & Cosm.Ind. 75 (1954), 612, G.G. Insheep i Ind.Eng.Chem. 43 (1951), 1488, US patenter nr. 2.457.887, 2.803.584 og 2.809.892) er det altså kjent at bacitracin danner i vann tungt oppløselige komplekser med salter av toverdige metaller, som Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn og Cr, hvorav noen er temmelig farvet og noen endog bitre (Al). Anvendelsen av komplekser med jern og mangan og særlig zink har imidlertid vist sig vellykket. Dannelsen av bacitracinkomplekser med disse metaller anvendes fortrinnsvis ved fremstilling av dette antibiotikum på grunn av at chelat-bacitracinbindingen med disse metaller virker stabiliserende.

Zinkkomplekset av bacitracin er godtatt siden 1953, og anvendes i medisinen såvel som veterinært. Det har de fordeler at medisiner inneholdende zink-bacitracin kan endog varmestabiliseres på grunn av zink-bacitracinets høyere stabilitet, og på grunn av dets lavere oppløselighet har det fordeler, f.eks. ved at det oppløses langsomt i munnhulen ved behandling av inflammatoriske lidelser, og dessuten er zinkbacitracin bare ca. 1/5 så bittert som bacitracin selv.

Zinkbacitracin anvendes derfor også fortrinnsvis som en dyrefortilsetning. Dets stabilitet gjør det mulig å oppnå høye utbytter ved fremstilling av teknisk bacitracin, og særlig sluttproduktet kjennetegnes ved sin store lagringsdyktighet, idet det ikke taper sin virkning selv etter 2 års lagring.

Zinkbenzyliden-bacitracin har de samme fordelaktige egenskaper som zink-bacitracin, hvilket skyldes nærværet av kompleksbundet zink. På grunn av bindingsvolumet av den frie aminosyre med aldehyd oppviser det imidlertid en enda lavere oppløselighet (ca. 1 µg/ml) enn zink-bacitracinets som er 2 størrelsesordener høyere. Det gir en øket stabilitet, særlig under fuktige forhold

og ved økede temperaturer. Det er derfor nyttig som et teknisk preparat for tilsetning til silofoor og andre forstoffer.

Ulemper og mangler ved de kjente metoder overkommes ifølge oppfinnelsen ved en fremgangsmåte ved fremstilling av nye, antibiotisk aktive, stabile og i vann tungt oppløselige bacitracinforbindelser, ved feldning fra en vandig bacitracinoppløsning i pH-området 6,0 - 9,5, fortrinnsvis 7,0 - 8,0 med et oppløselig salt av zink, mangan, nikkel, cobolt eller jern, idet fellingen ut-

føres i nærvær av furfural, benzaldehyd eller salicylaldehyd.

Under de nevnte betingelser skjer endog fra meget fortynnede bacitracinoppløsninger en praktisk talt kvantitativ utskillelse av forbindelsen med det anvendte aldehyd i form av et kompleks-salt med det anvendte metall. De erholdte komplekser er i alminnelighet meget lite oppløselige i vann. Deres antibiotiske aktivitet tilsvarende aktiviteten av det bundne bacitracin. I surt pH-område er kompleksene oppløselige, idet de spaltes i utgangskomponentene.

De nevnte nye komplekser kan anvendes til økonomisk og teknisk lite krevende utvinning av bacitracin fra store volum fortynnede, vandige oppløsninger. Kompleksene kan allerede direkte tjene til forskjellige tekniske formål, eksempelvis til isolering av bacitracin, som førmiddeltilsetning eller som utgangsmateriale ved fremstilling av ønskede bacitracinformer.

Hvis man opparbeider den komplekse bacitracinforbindelse ved spaltning i surt medium, kan det frigjorte aldehyd gjenvinnes.

Eksempel 1

Fermenterte media ved industriell dyrkning av produksjonsmikroorganismen *Bacillus licheniformis* blev efter innstilling av pH på 3,0 befridd for biomassen ved sentrifugering, og den erholdte klare væske blev innstillet på pH 5,5 med en natriumhydroxydoppløsning. Den biologiske aktivitet utgjorde 180 E/ml. 5 liter av denne væske blev tilsatt 15 g friskt destillert furfural og 5 g zinksulfat. Efter oppløsning av tilsetningene blev pH-verdien av reaksjonsblandingen innstillet på 7,6. Efter 45 minutters omrøring blev det utskilte produkt avsuget og vasket med litt vann. Efter tørring fikk man 21 g av et grålig pulver hvis aktivitet, målt efter oppløsning i en sitronsyreoppløsning, utgjorde 38,9 E/mg, hvilket tilsvarende et utbytte på 90,7 %, beregnet på virkestoffinnholdet

i det filtrerte gjæringsmedium. Den på biologisk vis bestemte aktivitet av morluten utgjorde 9,6 E/ml, dvs. 5,3 %. Zinkinnholdet av preparatet utgjorde 6,21 %.

Eksempel 2

5 liter av væsken anvendt i eksempel 1 blev ved en pH på 5,5 under omrøring tilsatt 16 g benzaldehyd og 3 g zinksulfat. Efter innstilling av pH-verdien på 7,8 og efter 45 minutters omrøring, blev det utskilte, uoppløselige kompleks avsuget, derpå vasket først med 250 ml vann og derpå med 100 ml aceton og tørret i vakuum. Utbyttet var 20,5 g av et svakt gullig pulver hvis aktivitet, målt efter oppløsning i en sitronsyreoppløsning, utgjorde 42 E/mg, hvilket tilsvarte et utbytte på 95,6 %, beregnet på virkestoffinnholdet av den filtrerte gjæringsvæske. I morluten blev der funnet 4,5 E/ml, dvs. 2,5 %. Zinkinnholdet av preparatet utgjorde 4,9 %.

Eksempel 3

2,5 liter av væsken anvendt i eksempel 1 blev ved en pH på 5,5 tilsatt 100 ml av en 2,5 %-ig zinksulfatoppløsning og 7 g salicylaldehyd. Under omrøring blev pH-verdien innstillet på 7,4, og efter 30 minutter blev det utskilte, uoppløselige kompleks avsuget og vasket med 150 ml vann og 150 ml aceton. Utbyttet var 11,2 g av et gullig pulver med en biologisk aktivitet på 40 E/mg, hvilket tilsvarte et praktisk talt kvantitativt utbytte. I morluten kunne ingen biologisk aktivitet påvises mer. Zinkinnholdet i preparatet utgjorde 4,1 %.

P a t e n t k r a v

Fremgangsmåte ved fremstilling av nye, antibiotisk aktive, stabile og i vann tungt oppløselige bacitracinforbindelser, ved felning fra en vandig bacitracinoppløsning i pH-området 6,0 - 9,5, fortrinnsvis 7,0 - 8,0, med et oppløselig salt av zink, mangan, nikkel, cobolt eller jern, k a r a k t e r i s e r t v e d at felningen utføres i nærvær av furfural, benzaldehyd eller salicylaldehyd.

Anførte publikasjoner:

U.S. patent nr. 3.035.919 (99-2)
Hockenhull, D.J.D.: Progress in Industrial Microbiology, Vol. V, London, p. 96, 129