



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑤① Int. Cl. 3: C 12 P 19/64

**Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein**  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑪

**625 830**

<p>⑳① Gesuchsnummer: 6939/75</p> <p>㉒② Anmeldungsdatum: 29.05.1975</p> <p>㉓③ Priorität(en): 10.06.1974 US 477766</p> <p>㉔④ Patent erteilt: 15.10.1981</p> <p>㉕⑤ Patentschrift veröffentlicht: 15.10.1981</p>	<p>㉖⑦③ Inhaber: The Upjohn Company, Kalamazoo/MI (US)</p> <p>㉗⑦② Erfinder: Malcolm Edward Bergy, Kalamazoo/MI (US) John Henry Coats, Kalamazoo/MI (US) Vedpal Singh Malik, Kalamazoo/MI (US)</p> <p>㉘⑦④ Vertreter: E. Blum &amp; Co., Zürich</p>
--	--

⑤④ **Verfahren zur Herstellung des Antibiotikums Lincomycin.**

⑤⑦ Das Antibiotikum Lincomycin wird erhalten, wenn man *Streptomyces vellosus* mit der Hinterlegungsnummer NRRL 8037 in einem wässrigen Medium unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur im Bereich von 18° C bis 45° C züchtet, bis in dem Medium eine wesentliche Antibiotikum-Aktivität durch die Bildung von Lincomycin erreicht ist, und anschliessend das gebildete Lincomycin aus der Gärbrühe isoliert.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung des Antibiotikums Lincomycin, dadurch gekennzeichnet, dass man *Streptomyces vellosus* mit der Hinterlegungsnummer NRRL 8037 in einem wässrigen Medium unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur im Bereich von 18 °C bis 45 °C züchtet, bis in dem Medium eine wesentliche Antibiotikum-Aktivität durch die Bildung von Lincomycin erreicht ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das zur Züchtung verwendete wässrige Nährmedium ein vom Mikroorganismus abbaubares Kohlehydrat und ein vom Mikroorganismus abbaubares Stickstoff enthaltendes Material enthält.

3. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass das gebildete Lincomycin aus der Gärbrühe isoliert wird.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein mikrobiologisches Verfahren zur Herstellung des Antibiotikums Lincomycin. Dieses mikrobiologische Herstellungsverfahren wird bei Temperaturen, die im Bereich von 18° bis 45 °C liegen, unter Verwendung des in neuester Zeit entdeckten Mikroorganismus *Streptomyces vellosus* durchgeführt.

Das erfindungsgemässe Verfahren zur Herstellung des Antibiotikums Lincomycin ist dadurch gekennzeichnet, dass man *Streptomyces vellosus* mit der Hinterlegungsnummer NRRL 8037 in einem wässrigen Medium unter aeroben Bedingungen bei einer Temperatur im Bereich von 18 °C bis 45 °C züchtet, bis in dem Medium eine wesentliche Antibiotikum-Aktivität durch die Bildung von Lincomycin erreicht ist.

Das erfindungsgemässe Verfahren führt in vorteilhafter Weise zur Herstellung von Lincomycin, ohne dass gleichzeitig eine Bildung von Lincomycin B (4'-Depropyl-4'-äthyllincomycin) auftritt. Dadurch, dass beim erfindungsgemässen Verfahren nicht gleichzeitig Lincomycin B gebildet wird, kann man das Lincomycin in erhöhter Ausbeute leichter gewinnen.

Das Antibiotikum Lincomycin wurde früher als *Lincolnensis* var. *lincolnensis*, NRRL 2936 gebildet werden, wie dies in der US-Patentschrift Nr. 3 086 912 beschrieben wird. Der Temperaturbereich, bei dem die Züchtung bzw. Bebrütung zur Herstellung von Lincomycin vorgenommen wird und der in dem oben erwähnten Patent angegeben ist, liegt im Bereich von 18 °C bis 40 °C und vorzugsweise im Bereich von 26 °C bis 30 °C. Bei dem Gärverfahren oder der Fermentation zur Herstellung von Lincomycin wird auch eine weitere Verbindung gebildet, die als Lincomycin B bezeichnet wird. Obwohl das Lincomycin und das Lincomycin B eine Aktivität im wesentlichen gegen das gleiche Spektrum an Mikroorganismen aufweist, ist dennoch bekannt, dass das Lincomycin B bedeutend weniger aktiv gegen diese Mikroorganismen ist als Lincomycin. Aus diesem Grund stellt das Lincomycin das bevorzugte Antibiotikum der beiden genannten dar.

Bei der Durchführung des oben beschriebenen Fermentationsverfahrens ist es notwendig, in den meisten der Vorrichtungen eine grosse Menge an Kühlwasser einzusetzen, um die erwünschte Fermentationstemperatur aufrecht zu erhalten. Ausserdem führt die Aufrechterhaltung einer Temperatur im Bereich von 18 °C bis 45 °C, die für die Herstellung des Antibiotikums, wie oben erwähnt wurde, notwendig ist, zu eine Begünstigung der Entwicklung Vermehrung und Sprossung von unreinigenden Mikroorganismen in dem Gärbehälter.

Ziel der vorliegenden Erfindung war es, eine fermentative Herstellung von Lincomycin zu erreichen, wobei gefunden

wurde, dass dieses Ziel durch die Verwendung von neuen Mikroorganismen, nämlich des Mikroorganismus *Streptomyces vellosus* var. *vellosus*, NRRL 8037 und Lincomycin bildender Mutanten dieses Mikroorganismus in einem Gärverfahren bei einer Temperatur im Bereich von 18 °C bis 45 °C erzielt werden kann. Es wurde ferner in völlig unerwarteter Weise gefunden, dass das Ausmass an Lincomycin, das bei 45 °C gebildet wird, also der Lincomycintiter bei 45 °C vergleichbar dem Ausmass an Lincomycin ist, das bei 28 °C erreicht wird.

Die Herstellung von Lincomycin bei 28 °C und bei 45 °C, die mit Hilfe des beim erfindungsgemässen Verfahren einzusetzenden Mikroorganismus erreicht wird, wird in der folgenden Tabelle angeführt. Die Zonengrössen der Hemmung sind dabei in dieser Tabelle für die einzelnen Testorganismen in Millimetern angegeben. Dieser Test ist ein standardisierter mikrobiologischer Scheibenprüftest, der unter Verwendung von Papierscheiben von 13 mm durchgeführt wurde:

Tabelle

Mikroorganismus	28 °C	45 °C
<i>Bacillus subtilis</i>	21	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	22	24
<i>Sarcina lutea</i>	31	29
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0
<i>Salmonella schottmuelleri</i>	0	0
<i>Mycobacterium avium</i>	22	25
<i>Penicillium oxalicum</i>	0	0

Die Ergebnisse, die in der oben angeführten Tabelle zusammengefasst sind, sind völlig unerwartet, denn Tests haben gezeigt, dass *S. lincolnensis* var. *lincolnensis*, NRRL 2936 dann kein Lincomycin bildet, wenn er bei einer Temperatur von etwa 45 °C bebrütet wird.

Ein wesentlicher Vorteil der beim erfindungsgemässen Verfahren durch die Verwendung des erwähnten Mikroorganismus zur Herstellung von Lincomycin erreicht wird, ist derjenige, dass die Kühlung des Gärbehälters weniger kritisch ist, d. h. dass der Gärbehälter eine geringere Kühlkapazität benötigt. Dieser Vorteil fällt vor allem dort ins Gewicht, wo in Gebieten gearbeitet wird, die ein warmes Klima aufweisen und auch in Gebieten, in denen die Wasserversorgung beschränkt ist, denn Wasser ist das übliche Kühlmittel, um die Fermentationstemperaturen aufrechtzuerhalten. Ein weiterer bedeutender Vorteil des erfindungsgemässen Verfahrens besteht darin, dass Lincomycin gebildet wird, ohne dass gleichzeitig eine Erzeugung von Lincomycin B erfolgt.

## Beschreibung der Mikroorganismen

Die neuen Actinomyceten, die zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens zur Herstellung von Lincomycin angewandt werden, sind *Streptomyces vellosus*. Eine der charakteristischen Eigenschaften dieses Stammes besteht darin, dass er Lincomycin bildet, ohne dass gleichzeitig eine Herstellung von Lincomycin B erfolgt. Eine andere Eigenschaft des Stammes ist diejenige, dass er vergleichbare Titer an Lincomycin bei der Temperatur von 28 °C und ebenso bei der Temperatur von 45 °C liefert. Eine Unterkultur dieses lebenden Organismus kann auf Anfrage von der ständigen Sammlung der Northern Regional Research Laboratories, Agricultural Research Services, U.S. Department of Agriculture, Peoria, Illinois, USA erhalten werden. An dieser Hinterlegungsstelle ist die Hinterlegungsnummer des fraglichen Mikroorganismus NRRL 8037.

Der zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens herangezogene Mikroorganismus wurde von Alma Dietz im

Forschungslabor der Firma Upjohn studiert und in seinen Eigenschaften beschrieben.

Eine wärmebeständige Streptomyces Spezies, die aus Bodenproben aus Arizona isoliert wurde, bildet das Antibiotikum Lincomycin. Die Kulturen dieses Mikroorganismus können leicht von anderen Lincomycin bildenden Mikroorganismen unterschieden werden, wie dies aus den Einzelheiten zu ersehen ist, die in der Tabelle IV zusammengestellt sind. Die Eigenschaft der Wärmebeständigkeit, die unter dem Mikroskop zu beobachtenden langen geraden Sporenketten, die am Ende eingerollt sind, die Sporen mit langen Dornen und Haaren und die deutliche Antibiotikum bildende Fähigkeit des Mikroorganismus Streptomyces vellosus, wurden bisher für keine andere Streptomyces Spezies beschrieben, welche die blau-graue gefärbte Sporenmasse besitzen, wie sie in den signifikanten und klassifizierenden Streptomyces betreffenden Publikationen von Autoren beschrieben sind. Es sei in diesem Zusammenhang auf die folgenden Literaturzitate hingewiesen: Hütter [Hütter, R. 1967, «Systematik der Streptomyces unter besonderer Berücksichtigung der von ihnen gebildeten Antibiotica», S. Karger, Basel],

Krassilnikov [Krassilnikov, N.A. et al. 1966, «Biology of Antibiotic-Producing Actinomycetes», Akademiya Nauk SSSR herausgegeben von Ya. I. Rautenstein, veröffentlicht für das U.S. Department of Agriculture and the National Science Foundation, Washington, D.C. von dem Israel Program for Scientific Translations],

Kutzner [Kutzner, H.J. 1956, «Beitrag zur Systematik und Ökologie der Gattung Streptomyces Waksman et Henrici», Diss. Landw. Hochs. Hohenheim]

Pridham, et al. [Pridham, T.G., C.W. Hesseltine und R.G. Benedict. 1958, «A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups. Placement of strains in morphological sections», Applied Microbiol. 6: 52-79],

Shirling und Gottlieb [Shirling, E.B., und D. Gottlieb, 1968, «Cooperative description of type cultures of Streptomyces, II. Species descriptions from first study», Int. J. of Syst. Bacteriol. 18: 69-189,

Shirling, E.B. und D. Gottlieb, 1968, «Cooperative description of type cultures of Streptomyces, III. Additional species descriptions from first and second studies», Int. J. of Syst. Bacteriol. 18: 279-392,

Shirling, E.B. und D. Gottlieb, 1969, «Cooperative description of type cultures of Streptomyces, IV. Species description from the second, third and fourth studies», Int. J. of Syst. Bacteriol. 19: 391-512,

Shirling, E.B. und D. Gottlieb, 1972, «Cooperative description of type strains of Streptomyces V. Additional descriptions», Int. J. of Syst. Bacteriol. 22: 265-394]

Trejo [Trejo, W.H. und R.E. Bennett. 1963, «Streptomyces species comprising the blue-spore series», J. Bacteriol. 85: 676-690] oder

Waksman [Waksman, S.A. 1961, «The actinomycetes, vol. 2, Classification, identification, and descriptions of genera and species», The Williams & Wilkins Co., Baltimore].

Aus den obigen Gründen wird vorgeschlagen, dass das isolierte Material als «Streptomyces vellosus Dietz, sp.n.» bezeichnet wird und dass diese Typen Spezies durch die Typen-Variante Streptomyces vellosus var. vellosus bezeichnet wird. Die Bezeichnung der Spezies und die Bezeichnung der Varianten werden nach denjenigen Regeln durchgeführt, die im Internationalen Codex der Nomenklatur von Bakterien (International Code of Nomenclature of Bacteria, 1966) herausgegeben vom Editorial Board of the Judicial Commission of the International Committee on Nomenclature of Bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 16: 459-490] festgelegt sind.

Streptomyces vellosus Dietz, sp.n.

Farbeigenschaften des Mikroorganismus

Beim Wachstum an der Luft ist er blau-grau bis grau. Melanin-positiv. Die Färbung auf Ektachrom (siehe die Veröffentlichung Dietz, A. 1954, «Ektachrome transparencies as aids in actinomycete classification», Ann. N.Y. Acad. Sci. 60: 152-154, wird in der Tabelle I angeführt. Farbeigenschaften zu Vergleichszwecken sind in der Tabelle II zusammengefasst.

Der Streptomyces vellosus kann in die blaue (B) Farbserie und die weisse (W) Farbserie von Tresner und Backus eingeordnet werden (siehe Tresner, H.D. und E.J. Backus, 1962, «System of color wheels for Streptomycete taxonomy», applied Microbiol. 11: 335-338).

Unter dem Mikroskop beobachtbare Eigenschaften des Mikroorganismus

Die Sporenketten sind lang und gerade mit einer festen bis offenen Spirale an ihrem Ende. Sporenketten-Spirale (S), wie sie von Pridham et al. beschrieben wurde (siehe Pridham, T.G., C.W. Hesseltine und R.G. Benedict 1958, «A guide for the classification of streptomycetes according to selected groups, Placement of strains in morphological sections», Applied Microbiol. 6: 62-79).

Die Sporen sind gross und in den meisten Fällen oval. Die Sporenoberfläche weist lange Dornen und Haare auf. Die Sporenoberfläche ist also in der Weise haarig, wie dies von Dietz und Mathews definiert wurde (siehe Dietz, A. und J. Mathews, 1971, «Classification of Streptomyces spore surfaces into five groups», Appl. Microbiol. 21: 527-533).

Eigenschaften des Mikroorganismus in der Kultur und biochemische Eigenschaften

Diese Eigenschaften sind in der Tabelle III zusammengestellt.

Vom Mikroorganismus aufgenommene kohlenstoffhaltende Materialien

Das Wachstum des Mikroorganismus S. vellosus auf verschiedenen kohlenstoffhaltenden Materialien wurde beobachtet, indem man die synthetischen Nährmedien von Pridham und Gottlieb bzw. von Shirling und Gottlieb verwendete. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Veröffentlichungen von Pridham, T.G. und D. Gottlieb, 1948, «The utilization of carbon compounds by some Actinomycetales as an aid for species determination», J. Bacteriol. 56: 107-114 sowie von Shirling, E.B. und D. Gottlieb, 1966, «Methods for characterization of Streptomyces species», Int. J. of Syst. Bacteriol. 16: 313-340, verwiesen.

In dem synthetischen Medium von Pridham und Gottlieb zeigte die Mikroorganismenkultur nur eine Spur eines Wachstums auf dem Vergleichsmedium (Grundmedium ohne Zugabe irgendeiner Kohlenstoff enthaltenden Verbindung) sowie auf einem Medium, das als Kohlenstoffquelle die folgenden Verbindungen enthielt: Dulcitol, D-Sorbit, Natriumoxalat und Natriumtartrat. Ferner zeigte die Kultur ein mässiges Wachstum, wenn das Grundmedium als Kohlenstoffquelle Natriumacetat, Natriumzitrat oder Natriumsuccinat enthielt. Ein gutes Wachstum zeigte der Mikroorganismus, wenn das Kulturmedium als Kohlenstoffquelle die folgenden Verbindungen enthielt: D-Xylose, L-Arabinose, Rhamnose, D-Fructose, D-Galactose, D-Glucose, D-Mannose, Maltose, Saccharose, Lactose, Cellobiose, Raffinose, Dextrin, Inulin, lösliche Stärke, Glycerin, D-Mannit und Inositol.

Die Kultur wuchs überhaupt nicht, wenn das Medium die folgenden kohlenstoffhaltenden Verbindungen enthielt: Salicin, Phenol, Cresol, Natriumformiat und Natriumalicylat.

In dem Medium von Shirling und Gottlieb wuchs die Kultur leicht auf dem negativen Medium zu Vergleichszwecken (negatives Kontrollmedium), nämlich dem Grundmedium ohne

Zugabe irgendeines kohlenstoffhaltenden Materials und ebenso auf dem positiven Medium zu Vergleichszwecken (positives Kontrollmedium), nämlich dem Grundmedium unter Zugabe von D-Glucose.

Das Wachstum war gleich wie oder besser als auf dem Grundmedium plus Glucose, wenn man dem Grundmedium als kohlenstofflieferndes Material die folgenden Verbindungen zusetzte: D-Xylose, Inosit, D-Mannit, Rhamnose oder Raffinose.

Das Wachstum war wesentlich besser als auf dem negativen Medium zu Vergleichszwecken, jedoch schlechter als auf dem D-Glucose enthaltenden positiven Vergleichsmedium, wenn man in dem Medium als Kohlenstoff lieferndes Material L-Arabinose, Saccharose oder D-Fructose verwendete.

Es ist zweifelhaft, ob ein Wachstum auf Cellulose auftritt.

Temperaturbedingungen bei der Züchtung

Der Mikroorganismus *S. Vellousus* gehört zur Gruppe der

wärmebeständigen Actinomyceten. Er wächst gut bei Temperaturen, die im Bereich von 18 bis 55 °C liegen. Das optimale Wachstum erfolgt bei Temperaturen, die im Bereich von 28 °C bis 37 °C liegen, und zwar in 10 bis 14 Tagen und bei 45 °C in 48 Stunden.

Eigenschaften des Mikroorganismus bezüglich der Bildung von Antibiotika

Der Mikroorganismus *S. vellousus* bildet das Antibiotikum Lincomycin.

Der Mikroorganismus stammt aus einer Bodenprobe aus Arizona.

Zur Züchtung wurde der als «Kulturtype» bezeichnete Mikroorganismus *Streptomyces vellousus* Dietz, sp.n. NRRL 8037, verwendet sowie der als «Typenvarietät» bezeichnete Mikroorganismus *Streptomyces vellousus* var. *vellousus* NRRL 8037.

Tabelle I  
Aussehen des *Streptomyces vellousus* auf Ektachrome\*

Agar-Agar-Medium	Oberfläche	Rückseite
Bennett	grau	gelblichbraun bis braun
Czapek-Saccharose	eine Spur grau	gelb bis gelblich braun
Maltose Typton	-	braun
Pepton-Eisen	-	braun
0,1% Tyrosin	eine Spur grau-blau	braun
Kasein-Stärke	blau-grau	gelblich braun bis braun

\* Siehe die Veröffentlichung Dietz, A., 1954, «Ektachrome transparencies as aids in actinomycete classification», Ann. N.Y. Acad. Sci. 60: 152-154.

Tabelle II  
Färbeeigenschaften zu Vergleichszwecken des *Streptomyces vellousus*

Agar-Agar-Medium	bestimmtes Material	Color Harmony Manual 3. Ausgabe 1948*	NBS Zirkular 553 1955**
Bennett's	O	(g) 15ba bis 5ba Blaufärbung bis muschelrosa	184 m, sehr blass-blau 189 gm, bläulich-weiss 9 m, weiss mit Stich ins rosa
	R	3gc leicht-gelbbraun	76 gm, leicht gelblich-braun
	P	3ie karamel, Ahornzucker, gelbbraun	76 m, leicht gelblich-braun 77 g, mässig gelblich-braun
Czapek Saccharose	O	3cb sandfarben	-
	R	3ec gelb, hell-beige	79 gm, leicht gräulich-gelblich braun 90 gräulich-gelb
Maltose-Trypton	P	-	-
	O	56a muschelrosa	9 weiss mit Rosastich
	R	31g ziegelbraun, zimtbraun, hellbraun	77 gm, mässig gelblich-braun
Hickey-Tresner	P	3ie karamel, Ahornzucker, gelbbraun	76 m, leicht gelblich-braun 77 g, mässig gelblich-braun
	O	15ba bis 3cb blaufarben bis sandfarben	184 m, sehr blass-blau 189 gm, bläulich-weiss
	R	31g ziegelbraun, zimtbraun, leicht-braun	77 m, mässig gelblich-braun
	P	31e zimtfarben, gelblich-ahornzuckerfarben	74 g, stark gelblich-braun 76 m, leicht gelblich-braun

Agar-Agar-Medium	bestimmtes Material	Color Harmony Manual 3. Ausgabe 1948*	NBS Zirkular 553 1955**
Hefeextrakt-Malzextrakt (ISP-2)	O	15ba bis 2ba Blaufärbung bis perl, muschelfarben	184 m, sehr blass-blau 189 gm, bläulich-weiss 92 gm, gelblich-weiss
	R	3b	74 g, stark gelblich-braun 76 m, leicht gelblich-braun
	P	31e	74 g, stark gelblich-braun 76 m, leicht gelblich-braun
Hafermehl (ISP-3)	O	15cb trübblau	184 m, sehr blass-blau 190 g, leicht bläulich-grau
	R	2gc bambusfarben, chamois	90 gm, gräulich-gelb
	P	-	-
anorganische Salze, Stärke (ISP-4)	O	19dc wässrig-grau	149 g, blass-grün 190 m, leicht bläulich-grau
	R	2fb bambusfarben, ledergelb, strohgelb, kornfarben	87 g, mässig gelb 89 m, blass gelb
	P	-	-
Glycerin-Asparagin (ISP-5)	O	15ba Blaufärbung	184 m, sehr blass-blau 189 gm, bläulich-weiss
	R	2fb bambusfarben, lederfarben, strohfarben, kornfarben	87 g, mässig-gelb 89 m, blass-gelb
	P	-	-

Die in der Spalte «bestimmtes Material» aufscheinenden Abkürzungen bedeuten das Folgende:

O Oberfläche  
R Rückseite  
P Pigment

Die Abkürzungen in der vorletzten und letzten Spalte bedeuten das Folgende:

(g) alle von der glänzenden Oberfläche des Farbgranulates  
g glänzende Oberfläche des Farbgranulates  
m matte Oberfläche des Farbgranulates  
gm glänzende oder matte Oberfläche des Farbgranulates

\* Jacobson, E., W.C. Granville, und C.E. Foës. 1948. Color harmony manual, 3. Ausgabe, Container Corporation of America, Chicago, Illinois.

\*\* Kelly, K.L., und D.B. Judd. 1955. «The ISCC-NBS method of designating colors and a dictionary of color names». U.S. Dept. Comm. Circ. 553.

Tabelle III

Eigenschaften der Kultur und biochemische Eigenschaften von *Streptomyces vellosus*

Medium	Oberfläche (Wachstum an der Luft)	Rückseite	andere Eigenschaften
Agar-Agar-Medien			
Pepton-Eisen	kein Wachstum bei 28 °C grau bei 45 °C	braun	braunes Pigment Melanin-positiv
Calcium-malat	Spur, weiss	farblos	kein Pigment Malat nicht löslich gemacht
Glucose-Asparagin	blass, weiss bis rosa	creme-farben bei 28 °C olive bei 45 °C	gelbes Pigment bei 28 °C kein Pigment bei 45 °C
entrahmte Milch	Spur, grau bei 28 °C kein Wachstum bei 45 °C	gelb-braun bis braun	gelb-braun bis braunes Pigment Casein nicht löslich gemacht

Medium	Oberfläche (Wachstum an der Luft)	Rückseite	andere Eigenschaften
Tyrosin	Spur, grau bei 28 °C gut, grau bei 45 °C	braun bei 28 °C gelb-braun bei 45 °C	braunes Pigment bei 28 °C gelb-braunes Pigment bei 45 °C Tyrosin bei 28 °C nicht löslich gemacht Tyrosin unter Wachstum bei 45 °C löslich gemacht
Xanthin	kein Wachstum bei 28 °C rosa bis weiss bei 45 °C	gelb	gelbes Pigment Xanthin nicht löslich gemacht
Nährstärke	kein Wachstum bei 28 °C rosa bis weiss bei 45 °C	gelb bis gelb-braun bei 28 °C gelb bei 45 °C	gelbes bis gelb-braunes Pigment bei 28 °C gelbes Pigment bei 45 °C Stärke wird nicht hydrolysiert
Hefeextrakt-Malzextrakt	rosa bis weiss (am besten bei 45 °C)	rot bis gelb-braun bei 28 °C gelb-braun bei 45 °C	rot bis gelb-braunes Pigment bei 28 °C gelb-braunes Pigment bei 45 °C
Bennett	blass baumwoll-farben bläulich-weiss	gelb-braun	gelb-braunes Pigment
Czapek-Saccharose Maltose-trypton	blass creme-farben rosa blass baumwollfarben, bläulich-weiss	gelb braun	gelbes Pigment braunes Pigment
Hichey-Tresner	blass baumwollfarben, bläulich-weiss	orange bis gelb-braun	blass gelb-braunes Pigment
Pepton-Hefeextrakt-Eisen (ISP-6)	keines	braun	braunes Pigment Melanin-positiv
Tyrosin (ISP-7)	rosa bis weiss	braun	braunes Pigment Melanin-positiv
Gelatin-Medien ohne weitere Zusätze	-	-	braunes Pigment an der Oberfläche olives Pigment in der oberen Hälfte keine Verflüssigung
Nährmedium	-	-	braunes Pigment an der Oberfläche gelb-braunes Pigment in der gesamten Kultur keine Verflüssigung - 2 Röhrchen eine Spur Verflüssigung - 2 Röhrchen
Brühen-Medien synthetisches Nitrat	-	-	farbloses vegetatives Wachstum durch die gesamte Brühe und am Grund; kein Pigment Nitrat wird nicht zu Nitrat reduziert
Nährmedium Nitrat	-	-	farbloses kompaktes Wachstum am Boden gelbes Pigment Nitrat wird nicht zu Nitrit reduziert
Lackmusmilch	weiss-graues Luftwachstum am Oberflächenring	-	braunes Pigment Lackmus wird bei pH 6,8 reduziert

Tabelle IV  
Vergleich von *Streptomyces vellosus* mit anderen Lincomycin produzierenden Mikroorganismen

	<i>S. vellosus</i> NRRL 8037	<i>S. lincolnsensis</i> NRRL 2936	<i>S. espinosus</i> NRRL 3890
Luftmyzel	blau-grau bis grau	creme-farben bis rosa bis grau	grau-grün
Melanin	positiv	positiv	negativ
Sporenketten	Spirale (S)- sehr lang und an den Spitzen eingerollt	lang, beweglich (RF)	kurz, gerade bis beweglich bis zu offenen Spiralen (RF, RA)-kurz
Sporen	kugelförmig	rechteckig	kugelförmig
Sporenoberfläche	lange Dornen und Haare	glatt mit Oberflächen-detail	zackig bis dornig Übergang zur haarig auf manchen Dornen
Calciummalat-Agar-Agar	Malat wird nicht löslich gemacht	Malat wird nicht löslich gemacht	Malat wird nicht löslich gemacht
entrahmte Milch-Agar-Agar	Kasein wird nicht löslich gemacht	Kasein wird nicht löslich gemacht	Kasein wird löslich gemacht
Tyrosin	wird nicht löslich gemacht	wird löslich gemacht	wird löslich gemacht
Xanthin	wird nicht löslich gemacht	wird um das Wachstumszentrum löslich gemacht	wird nicht löslich gemacht
Nährstärke	Stärke wird nicht hydrolysiert	Stärke wird hydrolysiert	Stärke wird hydrolysiert
	<i>S. pseudogriseolus</i> chemover linmyceticus NRRL 3985		<i>S. variabilis</i> chemover liniabilis NRRL 5618
Luftmyzel	grau bis weiss bis rot		grau bis weiss
Melanin	negativ		negativ
Sporenketten	kurz bis mittellang, gerade (RF) bis offene Spirale (RA) bis Spirale (S)		kurz bis mittellang beweglich (RF) bis offene Spirale (RA)
Sporen	oval bis länglich		oval bis länglich
Sporenoberfläche	leicht dornig bis glatt		glatt bis schwach warzig bis dornig
Calciummalat-Agar-Agar	Malat wird nicht löslich gemacht		Malat wird löslich gemacht
entrahmte Milch-Agar-Agar	Kasein wird unter Wachstum löslich gemacht		Kasein wird löslich gemacht
Tyrosin	löslich gemacht		löslich gemacht
Xanthin	löslich gemacht		löslich gemacht
Nährstärke	Stärke wird hydrolysiert		Stärke wird um die Wachstumszentren hydrolysiert

Lincomycin wird durch den neuen Mikroorganismus, der beim erfindungsgemässen Verfahren eingesetzt wird, produziert, wenn dieser Mikroorganismus in einem wässrigen Nährmedium unter submersen aeroben Bedingungen gezüchtet wird. Es sei darauf hingewiesen, dass für die Herstellung von beschränkten Mengen des Antibiotikums Oberflächenkulturen und Züchtungen in Kolben oder Flaschen angewandt werden können. Der Mikroorganismus wird am besten in einem Nährmedium gezüchtet, das ein kohlenstofflieferndes Material enthält, wie zum Beispiel ein abbaubares Kohlehydrat und ferner ein stickstofflieferndes Material, wie zum Beispiel eine abbaubare Stickstoff enthaltende Verbindung oder ein Protein oder proteinartiges Material. Bevorzugte, kohlenstoffliefernde Materialien sind beispielsweise Glucose, brauner Zucker, Saccharose, Glycerin, Stärke, Maisstärke, Getreidestärke, Lactose, Dextrin, Melassen und ähnliches.

Bevorzugte Stickstoff liefernde Materialien sind Maisquell-

wasser, Hefe, autolyierte Brauereihefe mit Milchstoffen, Sojabohnenmehl, Baumwollsamemehl, vermahlene Getreide, vermahlener Mais, Milchstoffe, durch Pankreas abgebautes Kasein, bei der Branntwein-Destillation verbleibende Rückstände, tierische Pepton enthaltende Materialien, Fischmehl, Fleischabfälle und Knochensplinter und ähnliches. Es kann vorteilhaft sein, Kombinationen aus derartigen kohlenstoffliefernden Materialien und stickstoffliefernden Materialien einzusetzen.

Spurenmetalle, wie zum Beispiel Zink, Magnesium, Mangan, Kobalt, Eisen und ähnliche Metalle müssen üblicherweise den Fermentationsmedien nicht zugesetzt werden, denn Leitungswasser und ungereinigte Bestandteile werden üblicherweise als Komponenten der Zuchtmedien verwendet und in diesen sind im allgemeinen bereits die erforderlichen Mengen der Spurenelemente enthalten.

Die Herstellung von Lincomycin nach dem erfindungsgemässen Verfahren wird bei einer Temperatur durchgeführt, die im Bereich von 18 °C bis 45 °C liegt und vorzugsweise erfolgt sie bei einer Temperatur im Bereich von 20 °C bis 45 °C. Üblicherweise wird eine optimale Bildung von Lincomycin während eines Zeitraumes von etwa 2 bis 10 Tagen erreicht. Der schliesslich aufscheinende pH-Wert ist zum Teil von Puffern, die gegebenenfalls anwesend sind, abhängig und zum Teil von dem anfänglichen pH-Wert, der in dem Zuchtmedium angewandt wurde.

Wenn die Züchtung in grossen Gefässen und Tanks durchgeführt wird, dann ist es vorzuziehen, für die Impfung dieser Gefässe mit dem Mikroorganismus die vegetative Form des Mikroorganismus einzusetzen und nicht die Sporenform, und zwar deshalb, weil durch die Verwendung der vegetativen Form eine zu lange Verweilzeit bei der Bildung von Lincomycin und damit eine zu wenig intensive Nützung der Fermentationsvorrichtung verhindert wird. Aus diesem Grund ist es wünschenswert, ein vegetatives Impfmmedium in einer Nährbrühenkultur herzustellen, und zwar indem man diese Brühenkultur mit einem Anteil einer Bodenprobe oder mit einer Schrägkultur beimpft. Wenn man so ein junges aktiv-vegetatives Impfmmedium hergestellt hat, dann wird dieses unter aseptischen Bedingungen in die grossen Gärbehälter oder Tanks übergeführt. Das Medium, in dem das vegetative Impfmmedium hergestellt wird, kann das gleiche sein, wie dasjenige, das zur Erzeugung des Lincomycins auf dem mikrobiologischen Weg herangezogen wird, oder es kann sich von diesem unterscheiden. Wesentlich ist, dass in dem Impfmmedium ein gutes Wachstum des Mikroorganismus erzielt wird.

Das nach dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellte Lincomycin kann beispielsweise nach denjenigen Arbeitsverfahren isoliert werden, die in der US-Patentschrift Nr. 3 086 912 beschrieben sind.

Bei bevorzugten Isolierverfahren wird das Lincomycin aus dem Zuchtmedium gewonnen, indem man die Myzele und die nicht gelösten Feststoffe nach üblichen Arbeitsverfahren abtrennt, beispielsweise durch Filtration oder durch Zentrifugieren. Das Lincomycin wird dann aus der durchfiltrierten oder zentrifugierten Brühe gewonnen, indem man diese Brühe über ein harzartiges Material leitet, das ein nicht-ionisches macroporöses Copolymeres des Styrols, welches mit Divinylbenzol vernetzt ist, enthält. Harzartige Materialien dieser Art, die verwendet werden können, sind in der US-Patentschrift Nr. 3 515 717 beschrieben. Ein typisches Beispiel für ein derartiges Austauschharz ist Amberlite XAD-2. Das Lincomycin wird von dem Harz unter Verwendung eines Lösungsmittelsystems eluiert, das aus Methanol und Wasser in einem Mischungsverhältnis von 95 Vol. zu 5 Vol. besteht.

Bioaktive Eluatfraktionen werden bei der Elution durch eine standardisierte mikrobiologische Plattentestmethode bestimmt, wobei man als Test-Mikroorganismus *Sarcina lutea* verwendet. Die biologisch aktiven Fraktionen werden dann vereinigt und zu einer wässrigen Lösung konzentriert, die dann einem Gefriertrocknungsverfahren unterworfen wird. Das gefriergetrocknete Material wird dann mit Methylenchlorid angerieben. Der so gewonnene Methylenchloridextrakt wird zur Trockene eingeeengt und der Rückstand mit Aceton angerieben. Das Filtrat wird dann mit Äther vermischt, wobei man einen Niederschlag erhält, der abgetrennt wird. Das zurückbleibende Filtrat wird dann mit einer 1n methanolischen Chlorwasserstoffsäure vermischt, um das farblose Lincomycin-Hydrochlorid auszufällen. Dieser Niederschlag wird dann durch Filtrieren isoliert und aus Wasser plus Aceton umkristallisiert, wobei man das kristalline Lincomycin-Hydrochlorid erhält.

Das erfindungsgemässe Verfahren ist nicht auf die Verwendung des speziellen Mikroorganismus beschränkt, der durch die hier beschriebenen Eigenschaften und seine Charakteri-

stika in der Kultur genau definiert wird. Es sei darauf hingewiesen, dass das erfindungsgemässe Verfahren auch unter Verwendung von Lincomycin produzierenden Mutanten des Mikroorganismus durchgeführt werden kann, wobei die Mutanten durch für den Fachmann bekannte Arbeitsverfahren hergestellt werden, beispielsweise indem man den neuen Mikroorganismus einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlen oder UV-Licht unterwirft, einer Behandlung mit Stickstofflost, eine Behandlung mit Phagen oder ein ähnliches Behandlungsverfahren durchführt.

Die Erfindung sei nun anhand von Beispielen näher erläutert, wobei in diesen alle Prozentsätze sich auf das Gewicht beziehen und alle Anteile in Lösungsmitteln sich auf das Volumen beziehen, ausser es werden ausdrücklich andere Angaben gemacht.

#### Beispiel 1

##### Arbeitsverfahren A - Gärverfahren bei 28 °C

Eine Bodenschrägkultur von *Streptomyces vellosus*, NRRL 8037 wird verwendet, um eine Reihe von 500-ml-Erlenmeyer-Kolben zu beimpfen, die 100 ml eines sterilen Mediums enthalten, das die folgende Zusammensetzung aufweist.

Beimpfungsmedium	
Bestandteil	Menge
Glucose-monohydrat	25 g/l
Pharmamedia*	25 g/l
Leitungswasser	auf 100 ml
pH-Wert des Mediums vor der Sterilisation	7,2

\* Pharmamedia ist eine industriell erhältliche Qualität von Baumwollsaamenmehl, das von Traders Oil Mill Company, Fort Worth, Texas, hergestellt wird.

Die Erlenmeyerkolben werden 3 Tage bei 28 °C auf einer Rotationsschüttelmaschine behandelt.

Das so erhaltene Besämlungsimpfmmedium wird verwendet, um eine Reihe von 500-ml-Erlenmeyer-Kolben zu Fermentationszwecken zu beimpfen, wobei diese Erlenmeyerkolben 100 ml eines sterilen Mediums enthielten, das aus den folgenden Bestandteilen aufgebaut war:

Bestandteil	Menge
Glucose-monohydrat	15 g/l
Wilson's Peptone Liquor No. 159*	15 g/l
Difco-Hefextrakt**	2,5 g/l
Leitungswasser	auf 100 ml
pH-Wert vor der Sterilisation	6,0

\* Wilson's Peptone Liquor No. 159 ist ein Präparat von hydrolysierten Proteinen tierischen Ursprungs.

\*\* zur Verfügung gestellt von Difco-Laboratorien, Detroit, Michigan.

Die Kolben werden mit 5 ml des Impfmmediums pro 100 ml des Fermentationsmediums beimpft. Dann werden die Kolben bei 28 °C auf einer Rotationsschüttelmaschine bebrütet, die mit 250 Umdrehungen pro Minute und einem Anschlag von 6 cm arbeitete. Der Kolbeninhalt wird nach 96 Stunden Gärzeit dem Aufarbeitsverfahren unterworfen.

##### Arbeitsverfahren B - Gärverfahren bei 45 °C

Das zur Besämlung verwendete Impfmmedium, das oben

unter Verfahren A beschrieben wurde, wird verwendet, um eine Reihe von 500-ml-Erlenmeyer-Fermentationskolben zu beimpfen, die 100 ml eines sterilen Mediums enthalten, das aus den folgenden Bestandteilen aufgebaut ist:

Zuchtmedium	
Bestandteil	Menge
Glycerin	30 g/l
NZ-Amin B*	20 g/l
Difco-Hefeextrakt	2 g/l
Natriumchlorid	3 g/l
Leitungswasser	auf 100 ml
pH-Wert vor der Sterilisation	7,2

\* Eine Peptonmasse in Pulverform, die durch einen enzymatischen Abbau von Kasein mit Hilfe von Pankreas erreicht wurde.

Die Kolben werden mit 5 ml des Impfmediums pro 100 ml des Fermentationsmediums beimpft. Die Kolben werden dann bei 45 °C auf einer Rotationsschüttelmaschine bebrütet, die mit einer Umdrehungszahl von 250 Umdrehungen pro Minute und einem Anschlag von 6 cm arbeitete. Der Kolbeninhalt wird nach 96 Stunden Fermentationszeit der Aufarbeitung unterworfen.

#### Arbeitsverfahren C - Aufarbeitung der Fermentationsmedien

Das Lincomycin, das in den Zuchtungsmedien nach den Arbeitsverfahren A und B durch die Fermentation erzeugt wurde, wird in reiner Form gewonnen, indem man zunächst die Fermentationsmedien oder Gärbiere filtriert, und zwar unter Verwendung von Diatomeenerde als Filterhilfsmittel. Der Filterkuchen wird mit Wasser gewaschen und die Waschwässer werden mit dem klaren Filtrat vereinigt. Das klare Material, das durch die Vereinigung des Filtrates mit dem Waschwasser gewonnen wurde, wird dann über eine Säule geleitet, die mit Amberlite XAD-2 beschickt ist, wobei die Füllung der Säule

unter Verwendung von Wasser erfolgte. Das Lincomycin wird aus dem Harz unter Verwendung von Methanol plus Wasser in einem Vol.-Verhältnis von 95:5 eluiert. Die austretenden Fraktionen werden aufgefangen und durch Dünnschichtchromatographie auf Silikagel G analysiert, wobei man zur Entwicklung der Dünnschichtplatten ein Lösungsmittelsystem aus Methyläthylketon plus Aceton plus Wasser im Vol.-Verhältnis 186:52:20 verwendet. Aktive Fraktionen werden vereinigt, und konzentriert, bis sie wässrige Fraktionen darstellen und dann einer Gefriertrocknung unterworfen. Das trockene Material wird anschliessend mit Methylenchlorid angerieben. Der so gewonnene Methylenchloridextrakt wird dann bis zur Trockene eingeeengt. Der dabei erhaltene Abdampfungsrückstand wird mit Aceton angerieben. Das im Aceton unlösliche Material wird durch Filtration entfernt und das so gewonnene Filtrat mit Äther vermischt. Zu diesem Zeitpunkt fällt wieder unlösliches Material aus, das durch Filtrieren entfernt wird, und das dabei erhaltene Filtrat wird mit einer 1n methanolischen Chlorwasserstoffsäure vermischt. Dabei fällt Lincomycin-Hydrochlorid in farbloser Form aus und es wird durch Filtrieren isoliert. Dieses Material wird dann in die kristalline Form umgewandelt, indem man es aus Wasser plus Aceton umkristallisiert.

Die Menge an Lincomycin B, die bei einer üblichen Fermentation unter Verwendung von *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis* gebildet wird, hängt von der Zusammensetzung des Zuchtungsmediums, von der Bebrütungszeit, von der Temperatur, der Belüftung und ähnlichen Bedingungen ab. Unter üblichen Arbeitsbedingungen liegen die Mengen an Lincomycin B, die bei einer derartigen Gärung gebildet werden, im Bereich von 5 bis 10%, bezogen auf die gesamte Menge an Lincomycin, das anwesend ist. Das Lincomycin B wird durch wiederholte Umkristallisierung des Lincomycin-Produktes unter Verwendung von geeigneten Lösungsmitteln entfernt, beispielsweise unter Verwendung von Mischungen aus Wasser plus Aceton oder Wasser plus einem niederen Alkohol.

Beim erfindungsgemässen Verfahren wird jedoch kein Lincomycin B gebildet und deshalb sind derartige Umkristallisationsverfahren nicht nötig.