

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 166328 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3726/83

(51) Int.Cl.5

C 12 P 21/02
C 07 K 9/00

(22) Indleveringsdag: 15 aug 1983

(41) Alm. tilgængelig: 17 feb 1984

(44) Fremlagt: 05 apr 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 16 aug 1982 US 408369

(71) Ansøger: *AMERICAN CYANAMID COMPANY; Wayne; New Jersey, US

(72) Opfinder: Jack Peter *Waite; GB

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

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et højaktivt, myceliefrit avoparcin-alkylsulfat-kompleks

(56) Fremdragne publikationer

US pat. nr. 3856937

(57) Sammendrag:

3726-83

Ved fremgangsmåden behandles hel indhøstet fermenteringsmæsk indeholdende antibiotikum såsom avoparcin, BM123, BM123γ, gentamycin, streptomycin eller neomycin, med stærk syre ved pH 1,9-2,3, filtreres (eventuelt under tilsætning af filterhjælpe-middel) til fraskillelse af faste stoffer, især myceller, eventuelt under vask af filterkagen med vand, idet vaskevandet kombineres med det antibiotikumholdige filtrat, og den syrnede blanding tilsættes et selektivt adsorberingsmiddel såsom SiO₂/MgO₂ (2,2:1-6,5:1) eller aktivt kul, fortrinsvis med en partikelstørrelse på 2-15 μm, der filtreres, vaskes med vand og indstilles til pH 1-3, hvorpå det for mørkfarvede organiske derivater (dannet under fermenteringen) befrie-de filtrat behandles med en vandig opløsning indeholdende 10-20% af et alkalimetalkylsulfat, idet suspensionen koncentrerer sig til fraskillelse af udfældede faststoffer indeholdende antibiotikum/alkylsulfatkompleks, som derpå behandles med vandig ammoniak til pH 7-9 og dernæst tørres til dannelse af et stabilt antibiotikum/alkylsulfatkompleks med høj antibiotikaaktivitet

DK 166328 B

fortsættes

på mellem 34 og 45t.

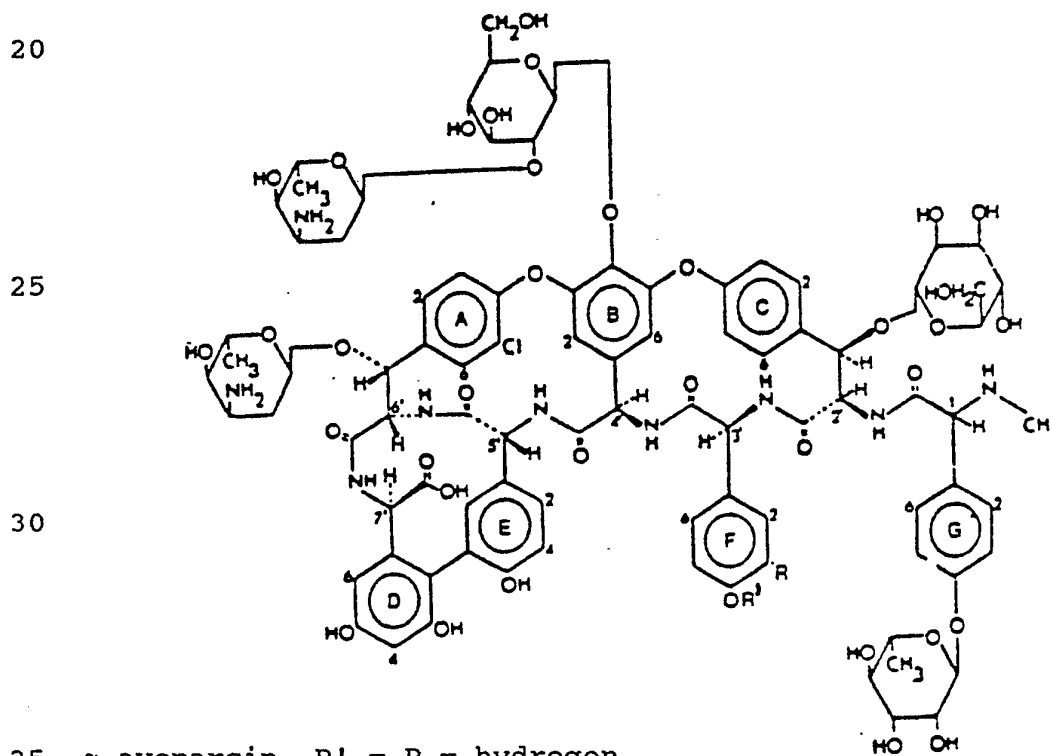
Ved fremgangsmåden fås et højaktivt, myceliefrit antibiotisk alkylsulfatkompleks i det væsentlige befriet for mørkfarvede organiske derivater frembragt under den antibiotiske fermentering, og som er særlig velegnet til brug i dyrefodere på grund af kraftigt forøget aktivitet under næsten kvantitativ udvinning af antibiotiket i hensigtsmæssig form (pulver) til indarbejdning i fodere og især foderkoncentrater.

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af et højaktivt, myceliefrit avoparcin-alkylsulfat-kompleks.

Avoparcin er et vigtigt antibiotikum på markedet, 5 der anvendes til foder til kødproducerende dyr for at fremskynde deres vækstrate. Dette antibiotikum fremstilles i reglen ved en fermenteringsproces og består i det væsentlige af to vandopløselige glycopeptider, der herefter omtales som α - og β -komponenten i avoparcin. Disse komponenter er 10 omtalt i følgende publicationer: W.J. McGahren m.fl., Structure of Avoparcin Components, Journal of the American Chemical Society, 102, 1671 (1980), og Avoparcin, Journal of the American Chemical Society, 101, 2237 (1979).

Avoparcins struktur (AV290) er vist i fig. I nedenfor. 15 α -Komponenten har den i fig. I viste konfiguration, hvor R' og R begge er hydrogen. I β -komponenten er R' hydrogen, medens R er chlor.

Fig. I



Når avoparcin (antibiotikum i fig. I) anvendes som tilskud til et dyrefoder, indgives det i reglen til dyrene, i eller sammen med foderet, i form af et alkylsulfatkompleks associeret med de tørrede faststoffer fra hele den høstede masse, hvori det er produceret. I praksis er dette produkt opnået ved en fremgangsmåde, der omfatter (1) syrning af hele den høstede masse fra fermenteringsprocessen indeholdende avoparcin, (2) behandling af hele den syrnede høstmasse med filterhjælp og alkalimetalkylsulfat, (3) filtrering af den således behandlede syrnede masse og (4) tørring af det udvundne faststof, der består af: Avoparcin--alkylsulfatkompleks, filterhjælp, mycelier og andre uopløselige fermenteringsstoffer. Selv om det således fremstillede produkt har været anvendt effektivt til fremskyndelse af vækstraten for dyr i næsten 10 år, uden at der har været rapporteret uønskede bivirkninger eller toksicitetsproblemer, begrænser den forholdsvis lave aktivitet af dette myceliumholdige produkt i en vis udstrækning salget af dette antibiotikum og de fysiske former, hvori det kan indgives. Der er derfor iværksat et ret omfattende forskningsprogram for at udvikle en praktisk og kommercielt lønnende fremgangsmåde til fremstilling af højaktivt, myceliefrit avoparcin.

Selv om teknikken antyder, at avoparcin-alkylsulfatkomplekser kan fås i en færdig form fri for mycelier, er de kendte metoder desværre ikke helt tilfredsstillende, når de anvendes i industriel målestok til fremstilling af den kvantitet avoparcin-alkylsulfatkompleks, der er nødvendig inden for den kødproducerende industri. De begrænses af lange filtreringsperioder og et betydeligt energi- og/eller brændstofforbrug, som er nødvendigt for at opnå den grad af tørring, der er nødvendig for at få tørt, stabilt produkt. Yderligere lader den fysiske form og udseendet af det avoparcin-alkylsulfatkompleks, der produceres i stor målestok, noget tilbage at ønske.

Det har nu overraskende vist sig, at der under den fermenteringsproces, hvorunder antibiotiket avoparcin dannes,

også produceres mørkfarvede, organiske derivater, der synes at være den primære kilde til de ovennævnte problemer. De hæmmer filtrering, forårsager dannelse af tjærelignende agglomerater i avoparcin-alkylsulfat-bundfaldet og hindrer
5 tørring af det produkt, der skal udvindes.

Det er derfor opfindelsens formål at tilvejebringe en fremgangsmåde til fremstilling af et højaktivt, myceliefrit avoparcin-alkylsulfat-kompleks, som er praktisk taget frit for mørkfarvede, organiske derivater, som er dannet
10 under avoparcinfermentering.

Disse ønskede resultater opnås ved den her omhandlede fremgangsmåde, som er ejendommelig ved, at den omfatter følgende trin:

(a) fremstilling af en fermenteringsvæske ved syring
15 af hele den høstede mæsk til en pH-værdi på 1,9-2,3 med en farmakologisk acceptabel syre og filtrering af den syrnede mæsk til opnåelse af et syrefiltrat, som er praktisk taget frit for mycelier og uopløselige fermenteringsstoffer,

(b) tilsætning til det myceliefri syrefiltrat af 5-
20 -50 g/liter adsorberende faststoffer, som er enten et magnesium-siliciumoxid-materiale med et forhold $\text{SiO}_2:\text{MgO}$ på mellem 2,2:1 og 6,5:1 eller aktivt kul,

(c) omrøring af den således dannede blanding i 15-45
minutter og fraskillelse af de adsorberende faststoffer og
25 mørkfarvede, organiske derivater fra det avoparcinholdige syrefiltrat,

(d) tilsætning til det syrnede filtrat, hvorfra de adsorberende faststoffer og de mørkfarvede, organiske derivater er fjernet, af et kompleksdannende middel valgt blandt
30 forbindelser med formlen: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{SO}_2-\text{OM}$, hvor n er et helt tal fra 9 til 17, og M er natrium eller kalium, eller blandinger deraf i en mængde på 0,5-1,5 g kompleksdannende middel pr. 1 g avoparcin,

(e) koncentrering af faststofferne i den med alkali-
35 metalalkylsulfat behandlede, syrnede væske og fraskillelse af brugt væske fra faststofferne, der indeholder avoparcin-

-alkylsulfat-komplekset,

(f) behandling af de avoparcinholdige faststoffer med vandig ammoniak til indstilling af deres pH-værdi på 6,5-9,0 og derefter tørring af den fremkomne blanding til udvinding af det højaktive, myceliefri avoparcin-alkylsulfat-

-kompleks, som er praktisk taget frit for mørkfarvede, organiske derivater, som er dannet under avoparcinfermenteringen.

10 Fremgangsmåden indebærer den yderligere fordel, at den lange filtreringsperiode, der normalt er påkrævet for at udvinde avoparcinkomplekset, nedsættes, og den kræver kun et minimalt forbrug af energi og/eller brændstof til tørring af det ønskede produkt.

15 Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen syrnnes hele den høstede fermenteringsmæsk indeholdende det i ovenstående fig. I viste antibiotikum.

Hele den høstede fermenteringsmæsk behandles med en passende mineralsyre, fortrinsvis svovlsyre, til en pH-værdi i intervallet 1,9-2,3, fortrinsvis 2,1-2,3. Andre egnede mineralsyrer er phosphorsyre og saltsyre. Den syrnede mæsk filtreres derefter på en egnet måde, f.eks. med et roterende vakuumfilter. Der kan tilsættes en smule gængs filterhjælp, såsom diatoméjord, til den syrnede mæsk for at lette filtrering, men dette er hverken vigtigt eller særlig ønskeligt ved den foretrukne fremgangsmåde ifølge opfindelsen som beskrevet heri. Filtratet fra denne behandling indeholder største delen af avoparcinet fra den syrnede mæsk og ledes til en opbevaringsbeholder til yderligere oparbejdning og udvinding.

Faststofferne fra denne filtrering kaldes den primære kage. Faststofferne indeholder faktisk alle de uopløselige stoffer i fermenteringsmæsken og mindre mængder tilbageholdt avoparcin. For at udvinde dette residualavoparcin opslættes den primære kage i vand og behandles med mineralsyre, fortrinsvis svovlsyre, til indstilling af opslæmningens pH-

-værdi på mellem 2,1 og 2,3. Derefter filtreres opslæmningen på passende måde, såsom med et roterende vakuumfilter. Filtratet fra denne behandling kombineres med syrefiltratet fra den indledende filtrering, og faststofferne derfra, der 5 indeholder de mycelier, der er dannet under avoparcinfermenteringen, kasseres som opbrugt kage.

Til det kombinerede syrefiltrat, der indeholder avoparcin og opløselige, mørkfarvede, organiske derivater, der er dannet under fermenteringen, sættes et stærkt selektivt 10 adsorberende, uorganisk faststof. Dette kan være attapulgit, magnesiumtrisilicat eller et syntetisk, hydratiseret magnesium-siliciumoxid-materiale, der forhandles som "Celkate T-21" af Johns Manville. Disse adsorptionsmidler har et forhold mellem SiO_2 og MgO på mellem 2,2:1 og 6,5:1 og en 15 gennemsnitlig partikelstørrelse i intervallet fra 2 til 15 μm , fortrinsvis 2,9-10 μm .

Alternativt kan der anvendes en passende kvalitet aktivt kul som adsorptionsmiddel. De foretrukne adsorptionsmidler er dog attapulgitler, magnesiumtrisilicat og et syntetisk, 20 hydratiseret magnesium-siliciumoxid-materiale. Den mængde, der tilsættes, ligger i intervallet 5-50 g, fortrinsvis 7,5-40 g, adsorptionsmiddel pr. liter syrefiltrat fra mæsken.

Blandingen af syrefiltrat og adsorptionsmiddel omrøres 25 i 15-45 minutter, fortrinsvis ca. 30 minutter, således at der kan foregå en selektiv adsorption af de mørkfarvede, organiske derivater (dvs. de organiske, mørkfarvede legemer, der forårsager, at der dannes tjærelignende agglomerater i avoparcin-alkylsulfat-bundfaldet) ved hjælp af adsorptionsmidlet. Om nødvendigt kan der sættes mineralsyre, fortrinsvis 30 svovlsyre, til den behandlede syrefiltratblanding for at holde dennes pH-værdi mellem 1,9 og 2,3, fortrinsvis ca. 2,0.

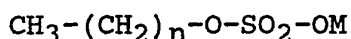
Efter ældning filtreres blandingen, vaskes med syret vand (pH 2,0), og faststofferne, der indeholder det brugte 35 adsorptionsmiddel og organiske, tjærelignende komponenter kasseres fra systemet. I praksis kan de brugte faststoffer

kasseres som spild, eller de kan behandles med vandig ammoniak for at opløse de mørkfarvede, organiske derivater og genvinde adsorptionsmidlet til recirkulation.

Syrefiltratet, der er frit for mycelier og mørkfarvede, organiske derivater, afkøles derefter til en temperatur mellem 5 og 15°C, fortrinsvis til 10-12°C. En vandig opløsning indeholdende 10-20, fortrinsvis 14-15, vægt% alkalimetalkylsulfat af kommerciel renhed sættes langsomt til filtratet, og den således dannede blanding får lov at ældes under omrøring i 0,5-1,5 time. Under ældningsprocessen får alkalimetalkylsulfat-syrefiltrat-blandingen lov at varme op til ca. 20°C. Derefter får faststofferne lov at bundfældes i blandingen, og spildvæsken fjernes ved dekantering eller på anden gængs måde.

Den mængde alkalimetalkylsulfat, der sættes til det avoparcinholdige syrefiltrat, ligger i intervallet fra 0,50 til 1,5 g, fortrinsvis fra 0,7 til 0,9 g, alkalimetalkylsulfat pr. g avoparcin.

De alkalimetalkylsulfater, der kan anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan gengives ved følgende formel



hvor n er et helt tal fra 9 til 17, og M er natrium eller kalium. Typisk er sådanne alkalimetalkylsulfater, der kan anvendes, f.eks. natriumdecylsulfat, kaliumhendecylsulfat, natriumlaurylsulfat, kaliumtridecylsulfat, natriummyristylsulfat, kaliumpentadecylsulfat, natriumcetyl-sulfat, kaliumheptadecylsulfat og natriumoctadecylsulfat. Blandinger af alkalimetalkylsulfater kan også anvendes, f.eks. en blanding af natriumhendecylsulfat og kaliumoctadecylsulfat, en blanding af kaliumdecylsulfat og natriumtridecylsulfat eller af kaliummyristylsulfat og natriumpentadecylsulfat. Når der anvendes blandinger af alkalimetalkylsulfater, fås en tilsvarende blanding af avoparcin-alkylsulfat-komplekser.

Det bundfældede salt fra ovennævnte behandling indeholdende avoparcin-alkylsulfat-komplekset neutraliseres med vandig ammoniak, og det neutraliserede slam tørres på gængs måde, f.eks. ved sprøjte- eller frysetørring, hvorved man 5 får produktet. Produktet har en antibiotisk aktivitet mellem 31 og 45% og er 300-400% kraftigere end biomasse indeholdende avoparcinprodukter og har en 100-200% større aktivitet end avoparcin-alkylsulfat-komplekser, der er fremstillet ved fremgangsmåder, der ikke sørger for fjernelse af de mørk- 10 farvede, organiske derivater fra avoparcinmæskens syrefiltrater før behandling med et alkalimetalkylsulfat.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er belyst grafisk ved det nedenfor i fig. II viste arbejdsdiagram.

Fig. II
(Arbejdsdiagram)

Tjærefrit og myceliefrit avoparcin

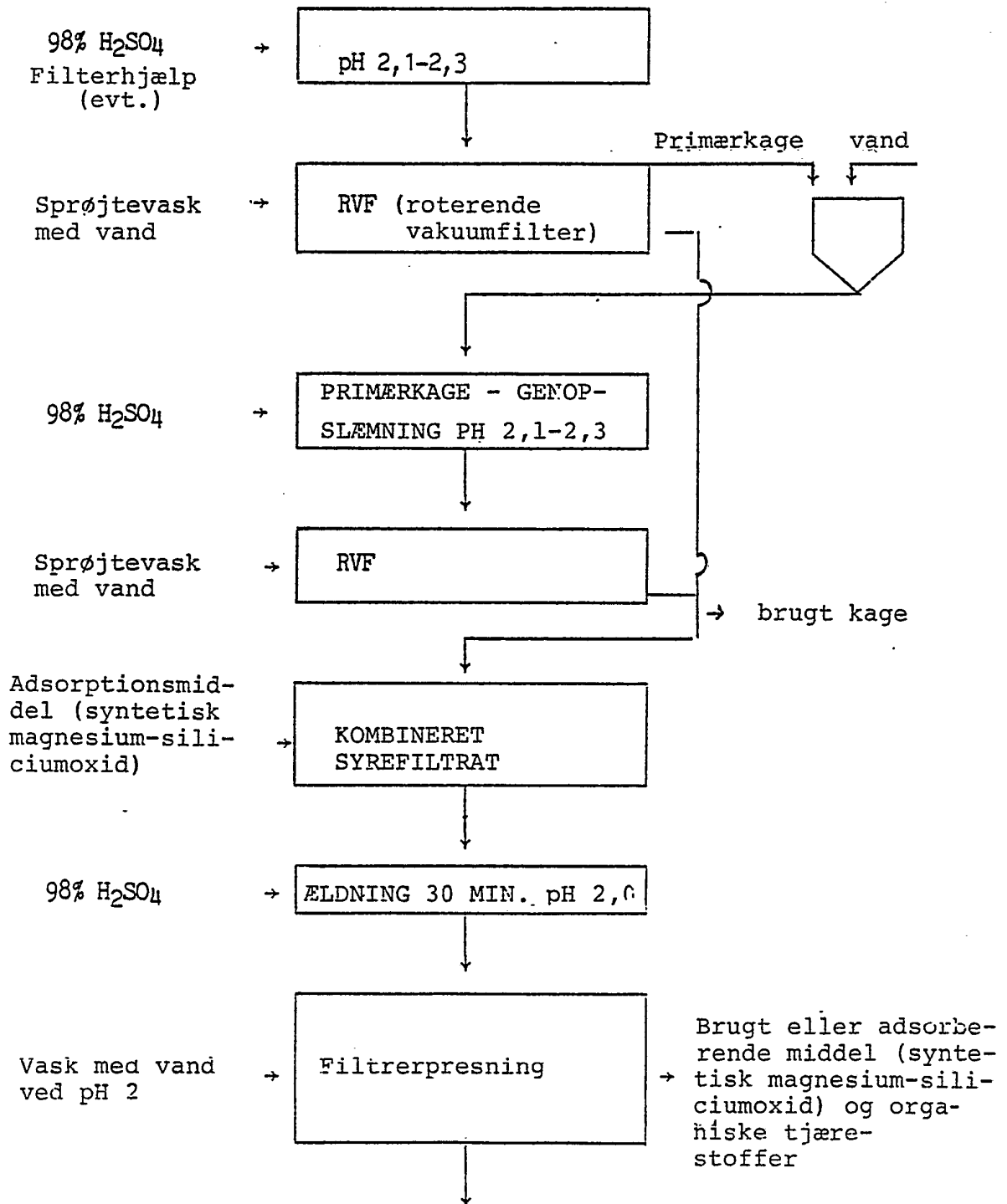
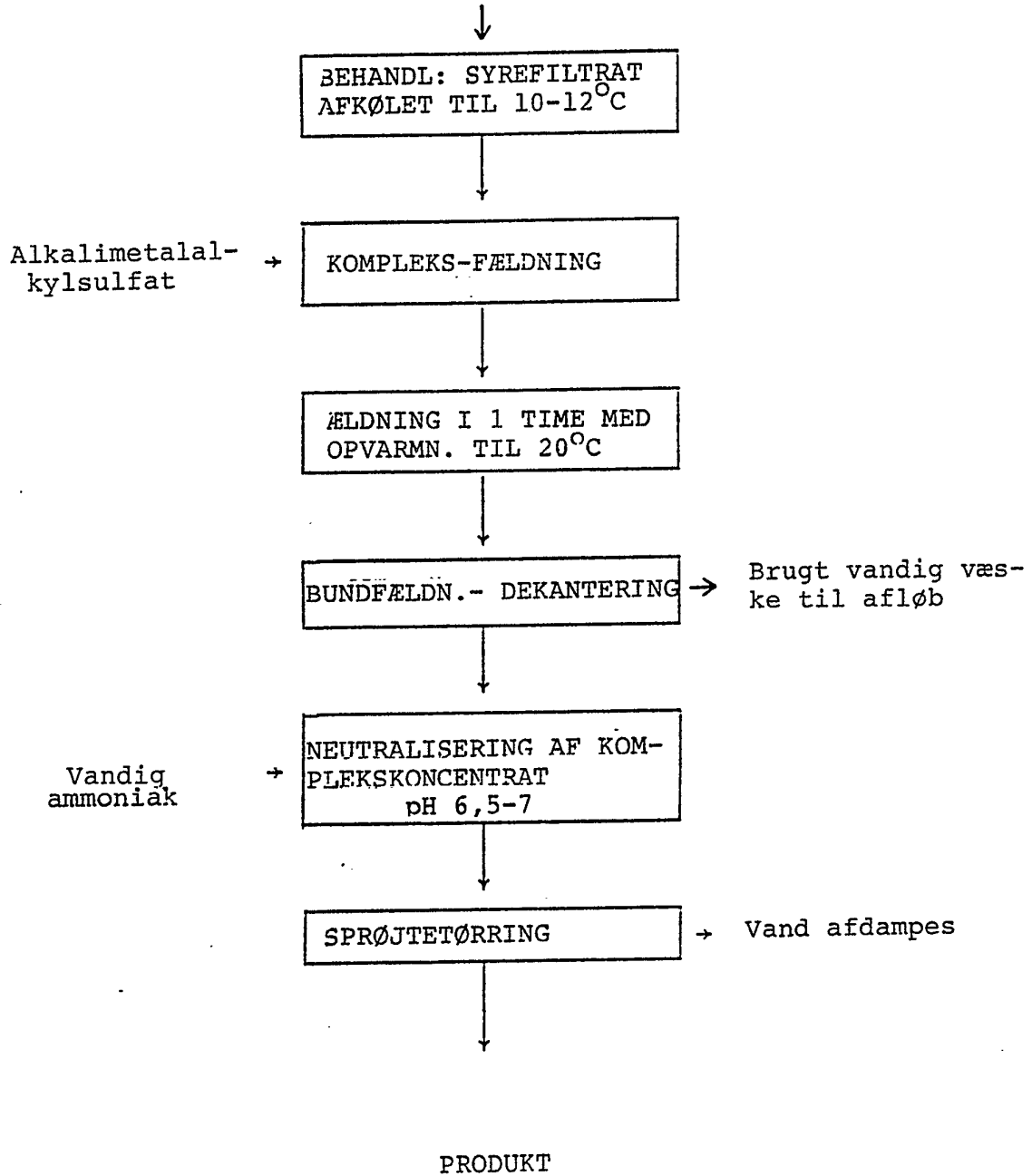


Fig. II (fortsat)
(Arbejdsdiagram)



Opfindelsen vil i det følgende blive nærmere forklaret ved hjælp af eksempler.

Eksempel 1

5 Fældning af avoparcin-natriumlaurylsulfat-kompleks ud fra syrefiltratet fra mæsken

En række produktionsfermenteringsmæske indeholdende antibiotiket avoparcin indstilles på pH 2,0-2,3 med 98%'s svovlsyre og filtreres ved hjælp af et med "Dicalite®" i
10 forvejen dækket Büchner-filter. En vandig 14%'s opløsning af natriumlaurylsulfat sættes langsomt til en prøve på 1 liter af syrefiltratet. På tidlige stadier af tilsætningen dannes et fint, gelatinøst bundfald, der er praktisk taget umuligt at fraskille både ved filtrering og centrifugering.
15 Fraskillelse kan kun ske ved filtrering ved hjælp af et alt for stort niveau filterhjælp. Efterhånden som udfældningen af avoparcin-laurylsulfat-komplekset nærmer sig et niveau på 90%, begynder partiklerne endvidere at agglomerere og få en tjærelignende konsistens. Når udfældningen er på over
20 ca. 90%, flokkulerer partiklerne ved yderligere tilsætning af natriumlaurylsulfat og agglomererer til store, halvflydende, tjærelignende klumper. Der findes ingen tilfredsstillende metode til fraskillelse af laurylsulfatkomplekset fra disse tjærelignende klumper.

25

Eksempel 2

Fældning af avoparcin-laurylsulfat-kompleks ud fra mæskens syrefiltrat i nærvær af calciumcarbonat

Fremgangsmåden i eksempel 1 gentages, bortset fra at
30 der anvendes prøver på 3-5 liter filtrat fra syret mæsk, og at der sættes 15-20 g CaCO₃ til mæskens syrefiltrat med pH 2. Delvis opløsning af CaCO₃ indtræder, og opløsningens pH forøges til 4,1-4,3. Blandingens pH genindstilles på 2-
-2,1 med svovlsyre. Der indtræder fuldstændig opløsning, og
35 calciumsulfat begynder at udfældes temmelig langsomt ved ældning. Der sættes en vandig 14%'s natriumlaurylsulfatop-

løsning til hver prøve, og der iagttages co-udfældning af calciumsulfat og avoparcin-laurylsulfat i hver prøve. Til at begynde med viser bundfaldet sig at være homogent i hver prøve, og alle udviser gode filtreringsegenskaber. Imidlertid 5 viser det sig, at alle opslæmninger, når de ældes i 30 minutter, begynder at adskilles. Antibiotikumkomplekset i hver prøve agglomererer og adskilles i tjærelignende klumper, hvorfra komplekset ikke kan udvindes med lethed.

10

Eksempel 3

Fældning af avoparcin-laurylsulfat-kompleks ud fra filtrat fra syrnede mæsk i nærvær af calciumhydroxid

Fremgangsmåden i eksempel 1 gentages igen, bortset fra at der anvendes prøver på 3-5 liter filtrat fra syrnede mæsk, og at der sættes $\text{Ca}(\text{OH})_2$ til mæskens filtrat med pH 15 2. Filtratprøver fra syrnede mæsk behandles med en 20%'s vandig kalkopslæmning og indstilles på pH 7-9 hermed. Derefter tilsættes en 14%'s natriumlaurylsulfatopløsning, og pH indstilles meget langsomt på 2,0 ved tilsætning af 98%'s 20 svovlsyre. Der dannes et bundfald indeholdende avoparcin-laurylsulfat-komplekset, der er homogent og til at begynde med let at filtrere. Som i det foregående eksempel indtræder der imidlertid udskillelse af komplekset i form af en tjære, når blandingen henstår i kort tid, dvs. ca. 30 minutter. 25 Produktet udvindes og analyseres for antibiotikumaktivitet. Det viser sig, at produktet har en aktivitet i intervallet 17-22%. De opnåede data er anført nedenfor.

		12				
Forsøg nr.		1	2	3	4	Gen. sn.
5	Antibiotikumaktivitet i syrnet mæskfiltrat (gram/liter)	13,64	12,00	10,45	10,45	11,64
10	g SLS ¹ /g avoparcin i behandlet syrefiltrat	0,69	0,82	1,0	1,0	0,88
	<u>% effektivitet²</u>					
15	Behandl. filtrat/-sprøjtetørret produkt	98,8	96,9	102,9	93,8	98,1
	I alt	90,0	91,1	98,0	87,6	91,8
20	Antibiotikumaktivitet i sprøjtetørret produkt (% på basis af tørstofindhold)	21,68	20,6	18,7	17,45	19,6

25

1 SLS = natriumlaurylsulfat.

2 Antibiotikumaktivitet overført fra filtrat til tørprodukt.

30

Når disse data sammenlignes med data opnået ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, dvs. nedenstående eksempler 7-9, fremgår det, at fremgangsmåden ifølge opfindelsen giver et produkt med en 100-200%'s forbedring med hensyn til aktiviteten af det udvundne avoparcin-laurylsulfat-kompleks i forhold til den, der opnås ved ovennævnte behandling.

35

Eksempel 4

Fældning af avoparcin-laurylsulfat-kompleks fra syrnet mæskfiltrat i nærvær af en række forskellige, findelte, faste adsorptionsmidler

40

Ved disse forsøg filtreres hele den høstede, syrnede fermenteringsmæsk indeholdende antibiotiket avoparcin, mycelier og alle de komponenter, der fremkommer ved fermenteringsprocessen. Syrefiltratet opdeles derefter i prøver med ens volumen, og de enkelte prøver behandles med 50 g/liter

45

findelt, fast attapulgit, bentonit, montmorillonit, pulveriseret cellulose, magnesiumtrisilicat eller et syntetisk, hydratiseret magnesium-siliciumoxid-materiale og en sådan mængde vandig opløsning indeholdende 14 vægt% natriumlaurylsulfat, at der fås 1,0 g natriumlaurylsulfat pr. g avoparcin-antibiotikum målt i filtratet fra den syrnede mæsk. Blandingerne omrøres i 30 minutter, således at avoparcin-laurylsulfatet får lov at dannes og derefter at bundfældes. I alle tilfælde iagttages, at der dannes mørkebrune, tjærelignende agglomerater i hvert af de udfældede faststoffer. Som følge heraf er alle behandlinger utilfredsstillende.

Eksempel 5

Fremstilling af avoparcin-laurylsulfat-kompleks ud fra syrnet mæskfiltrat forudbehandlet med en række forskellige, fin-
15 delte, faste adsorptionsmidler

Ved disse forsøg filtreres hele den høstede, syrnede fermenteringsmæsk indeholdende avoparcin-antibiotikum, mycelier og alle de komponenter, der udvikles under fermenteringsprocessen. Syrefiltratet opdeles derefter i prøver af lige stort volumen, og de enkelte prøver behandles med 50 g/liter findelt, fast attapulgit, bentonit, montmorillonit, pulveriseret cellulose, magnesiumtrisilicat eller syntetisk magnesium-siliciumoxid-materiale. Hver af blandingerne omrøres i 30 minutter og filtreres derpå. Faststofferne fra hver blanding udvindes, og farven undersøges.

Ved denne bedømmelse får adsorptionsmidler, der adsorberer betydelige mængder af de tjæredannende komponenter fra den syrnede mæsks filtrat, en mørkebrun farve. Når disse midler vaskes med vandig ammoniak, opløses de adsorberede tjæredannende komponenter ligeledes af vaskeopløsningen, hvilket giver denne en mørkebrun farve og får det faste adsorptionsmiddel til at genantage sit naturlige udseende.

Ved disse forsøg observeres det, at der sker en meget betydelig reduktion af farven på de filtrater af syrnet mæsk, der er behandlet med attapulgit, magnesiumtrisilicat

og syntetisk, hydratiseret magnesium-siliciumoxid-middel. Der sker imidlertid ingen afgørende ændring af farven på de filtratet af syrnet mæsk, der er blevet behandlet med bentonit, montmorillonit eller pulveriseret cellulose.

5 Endvidere er genvundet attapulgit, magnesiumtrisilicat og de syntetiske, hydratiserede magnesium-siliciumoxid-materialer fra ovennævnte behandlinger mørkebrune, medens genvundet bentonit, montmorillonit og pulveriseret cellulose fra disse behandlinger praktisk taget har uændret, naturlig
10 farve. Det viser sig således overraskende, at attapulgit, magnesiumtrisilicat og det anvendte, syntetiske, hydratiserede magnesium-siliciumoxid-materiale er stærkt selektive som adsorptionsmidler til de tjæredannende bestanddele, der findes i den høstede, syrnede antibiotikumfermenteringshel-
15 mæsk.

Portioner af hvert af de som ovenfor behandlede filtrater fra syrnet mæsk behandles derpå med en vandig opløsning indeholdende 14 vægt% natriumlaurylsulfat. Der tilsættes nok natriumlaurylsulfatopløsning til hver prøve til at give
20 1,0 g sulfat pr. g avoparcinantibiotikum, målt i filtrater fra den syrnede mæsk.

De udfældede faststoffer i hvert af filtraterne fra den syrnede mæsk forudbehandlet med attapulgit, magnesiumtrisilicat eller syntetisk, hydratiseret magnesium-silicium-
25 oxid-materiale er flødefarvede, og der findes intet tegn på agglomerering eller tjæredannelse i de udfældede avoparcin-laurylsulfat-komplekser. Imidlertid giver de filtrater fra syrnet mæsk, der er forudbehandlet med bentonit, pulveriseret cellulose eller montmorillonit, chokoladebrune bundfald
30 indeholdende tjærelignende agglomerater.

Fra ovennævnte data kan det ses, at attapulgit, magnesiumtrisilicat og syntetisk, hydratiseret magnesium-siliciumoxid-materiale er overraskende effektive, selektive adsorptionsmidler for organiske, tjæredannende komponenter i høstet, syrnet antibiotikumfermenteringshølmæsk, og at bentonit,
35 montmorillonit og pulveriseret cellulose ikke er selektive

til dette formål.

Ud fra de nedenfor anførte data fremgår det også, at forholdet mellem SiO_2 og MgO i de selektive adsorptionsmidler ligger fra 2,2:1 til 6,5:1, hvorimod de ikke-selektive, ineffektive adsorptionsmidler har et forhold mellem SiO_2 og MgO på 16,4:1 eller endnu højere.

Kemisk sammensætning af selektive og ikke-selektive adsorptionsmidler

10	% sammensætning som	Synt., hydratiseret magnesium-siliciumoxid-mat.	Attapulgit	Magnesiumtrisilicat	Bentonit	Montmorillonit
	SiO_2	65,5	68,0	68,5	64,17	68,96
15	MgO	14,9	10,5	31,5	3,90	1,53
	Al_2O_3	4,0	12,0	-	17,14	11,67
	CaO	0,4	1,7	-	1,48	1,47
	Fe_2O_3	1,1	5,0	-	4,81	6,28
	Andre	14,1	2,8	-	-	-
20	Forhold $\text{SiO}_2:\text{MgO}$	4,4:1	6,5:1	2,2:1	16,4:1	45,0:1

Signifikante fysiske egenskaber hos attapulgit og syntetisk, hydratiseret magnesium-siliciumoxid-materiale, der kan anvendes som selektive adsorptionsmidler til tjæredannende komponenter i filtrater fra syrnede avoparcinmække

30	Fysisk egenskaber	Syntetiske hydratiseret magnesium-siliciumoxid-materiale	Attapulgit
	Gennemsnitlig partikelstørrelse, μm	10	2,9 (95% finere end 10)
35	Vægtfylde	2,41	2,45
	Overfladeareal, m^2/g	180,0	125,0
	Massedensitet, kg/m^3	205	334

Eksempel 6

Bestemmelse af adsorptionsmidlernes effektivitet med hensyn til selektiv fjernelse af organiske, tjæredannende bestanddele fra syrefiltratet fra avoparcinmæsk med ringe eller ingen reduktion af dets indhold af avoparcin

5 Ved at følge den fremgangsmåde, der er beskrevet i forbindelse med ovenstående arbejdsdiagram, behandles alikvote mængder syrefiltrat fra avoparcin-mæske (pH 2) ved omrøring med forskellige mængder af hvert adsorptionsmiddel, 10 der bedømmes. De behandlede filtrater omrøres i 30 minutter og filtreres derpå for at fjerne adsorptionsmidlet og bestemme, om adsorptionsmidlerne selektivt fjerner organiske, tjæredannende bestanddele fra syrefiltraterne fra avoparcin-mæsken.

15 Farven på de filtrater, der fremkommer ved ovennævnte metode, måles ved hjælp af en optisk komparator i forhold til Hazen-farvestandarder, og filtraternes avoparcinindhold bestemmes ved højtryksvæskechromatografi (HPLC).

De opnåede resultater er anført nedenfor.

5	Adsorptionsmiddel	Tilsat mængde adsorp- tions- middel (g/liter)	Filtratfarve, Hazen-enheder (fort. 2:1 m. vand)	Avoparcin-HPLC- analyse af fil- trat (g/liter)
10	Ubehandlet syre- filtrat	-	500	10,20
	Attapulgitpulver	10,0	350	9,76
15		20,0	300	9,56
		30,0	200	9,22
		40,0	150/200	9,13
20	Attapulgit- granulat	10,0	400	9,89
	30/60	20,0	350	9,59
25		30,0	300	9,50
		40,0	200	9,35
30	Syntetisk, hydra- tiseret magnesium- -siliciumoxid- -materiale	10,0 20,0 30,0 40,0	450 400 350 300	10,17 10,24 10,22 10,27
35	Aktivt kul	2,5 5,0 7,5 10,0	400 350 200 150/200	10,18 10,09 9,90 9,78

Eksempel 7

45 Fremstilling af avoparcin-laurylsulfat-kompleks ud fra syrnet mæskfiltrat

2 prøver á 2,5 liter filtrat fra syrnet avoparcinmæsk (pH 2,0), hvorfra mycelier er blevet fjernet ved filtrering, omrøres med syntetisk, hydratiseret magnesium-siliciumoxid-
50 materiale i 15 minutter. De behandlede blandingers pH genind-
stilles på 2,0, og ældning af blandingerne fortsættes i

yderligere 15 minutter. Derefter filtreres det syntetiske, hydratiserede magnesium-siliciumoxid-(SHMSC)-materiale fra, og der fortrængningsvaskes med 500 ml vand indstillet på pH 2,0 med H₂SO₄.

5 Filtraterne kombineres og behandles med en 14%'s vandig opløsning af natriumlaurylsulfat, der bevirker udfældning af det flødefarvede avoparcin-laurylsulfat. Der iagttages ingen adskillelse eller tjæredannende agglomerater i bundfaldet.

10 Avoparcin-laurylsulfat-komplekset koncentrerer ved dekantering, og produktet fås ved sprøjtetørring af slammet, der er neutraliseret til en pH-værdi mellem 6,5 og 7,0 med vandig ammoniak. Resultaterne af disse prøver er vist nedenfor.

15

Forsøg nr.	1	2
20 SHMSC, gram/liter	40,0	50,0
25 Antibiotikum-aktivitet i syrnet mæskfiltrat (gram/liter)	16,68	16,68
25 g SLS/g avoparcin i behandlet syrefiltrat	0,82	0,85
30 <u>% effektivitet</u>		
Syrnet mæskfiltrat/-behandlet filtrat	100,0	99,6
35 Behandlet filtrat/-sprøjtetørret produkt	<u>92,35</u>	<u>92,3</u>
I alt	92,35	91,9
40 Antibiotikum-aktivitet i sprøjtetørret produkt (% på tørstofbasis)	38,0	36,4
45 SLS = natriumlaurylsulfat SHMSC = syntetisk, hydratiseret magnesium-siliciumoxid-materiale		

Eksempel 8Fremgangsmåde til fremstilling af myceliefrit og tjærefrit avoparcin-laurylsulfat-kompleks, komplet fra fermenteringsmæsk til sprøjtetørret produkt

5 Der fremstilles en række præparater for at få effektivitetsdata for hele fremgangsmåden fra fermenteringsmæsk til det sprøjtetørrede, myceliefri, tjærefri produkt. Den fremgangsmåde, der anvendes ved denne bedømmelse, er belyst i arbejdsdiagram II ovenfor.

10 I alle tilfældene udføres der mæskeekstraktion ved pH 2,0 (98%'s svovlsyre) med en sekundær ekstraktion af den primære, brugte kage ved hjælp af 600 ml vand pr. kg udgangsmæsk.

15 Det fremkomne, kombinerede syrefiltrat (CAF) behandles med syntetisk, hydratiseret magnesium-siliciumoxid-materiale (SHMSC) ved pH 2,0, filtreres, og filterremanensen fortrængningsvaskes med vand ved pH 2,0 (H_2SO_4).

20 Avoparcin-laurylsulfat-komplekset udfældes fra det behandlede syrefiltrat (TAF) ved hjælp af samme metode som beskrevet i fig. II ovenfor. Kompleksopløsningen koncentrerres ved bundfældning og dekantering, koncentratet neutraliseres (pH 6,5-7) med vandig ammoniak og sprøjtetørres derefter, hvilket giver produktet.

25 Resultaterne for en serie på 3 fremstillinger er anført nedenfor.

		20			
Fermenteringsmæsk					
charge nr.		3	4	5	Gen.sn.
5	Mængde ekstraheret mæsk, kg	1	1	1	-
	Antibiotikumaktivitet i mæsk (g/kg)	14,08	17,34	14,77	-
10	<u>% effektivitet:</u>				
	mæsk/CAF	90,0	92,8	91,0	91,2
15	CAF/TAF	96,5	100,0	98,0	98,2
	TAF/sprøjtetørret produkt	96,3	94,4	95,9	95,5
20	Samlet mæsk/sprøjtetørret produkt	83,6	87,6	85,5	85,6
	g SLS/g avoparcin i TAF	1,19	0,91	0,94	1,01
25	Antibiotikumaktivitet i sprøjtetørret produkt (% på tørstofbasis)	34,6	41,2	34,8	36,9

Eksempel 9

Fremgangsmåde til fremstilling af myceliefrit og tjærefrit avoparcin-laurylsulfat-kompleks komplet fra fermenteringsmæsk til sprøjtetørret produkt

Ved denne bedømmelse benyttes den fremgangsmåde, der er beskrevet i forbindelse med fig. II ovenfor.

35 Hele den høstede avoparcinfermenteringsmæsk syrnes til pH 2,0 med 98%'s H_2SO_4 og filtreres, idet der anvendes et roterende vakuumfilter til at skille mycelierne fra det avoparcinholdige filtrat.

40 Derefter behandles en portion på 6 liter af filtratet fra den syrnede mæsk (pH 2) med 50 g/liter syntetisk, hydratiseret magnesium-siliciumoxid-materiale med genindstilling af pH på 2,0.

45 Det brugte adsorptionsmiddel filtreres fra og fortrængningsvaskes med 1 liter vand ved pH 2,0 (H_2SO_4). Det samlede volumen af filtrat plus udvundet stof fra vask er 6,6 liter.

Komplekset fældes ved langsom tilsætning af 650 ml 15%'s natriumlaurylsulfat ved 8-10°C. Den fremkomne opslæmning opvarmes langsomt til 22°C under omrøring.

Efter bundfældning i 30 minutter dekanteres 5,26 liter så godt som klar, ovenstående væske fra.

Det tiloversblevne slamkoncentrat neutraliseres med vandig ammoniak og sprøjtetørres til udvinding af produktet.

10	Analyse	g/liter
	Avoparcin i:	
	Udgangsfiltrat fra syrnet mæsk	12,70
	Behandlet filtrat fra syrnet mæsk	11,49
15	<u>% effektivitet</u>	<u>%</u>
	Syrnet mæskfiltrat/behandlet filtrat	99,5
	Behandlet filtrat/dekanteret væske	3,1
	Behandlet filtrat/sprøjtetørret produkt	97,85
20	Total	97,36
	Avoparcinbalance	101,45
	g SLS/g avoparcin i behandlet filtrat	1,285
	Antibiotikumaktivitet i sprøjte-	
	tørret produkt (% på tørstofbasis)	30,6
25	<hr/>	

Ved disse bestemmelser viser det sig, at syntetisk, hydratiseret magnesium-siliciumoxid-materiale er yderst effektivt til fjernelse af organiske, tjæredannende kom-

30 ponenter fra filtratet fra syrnet avoparcinmæsk. Det viser sig også, at fjernelse af de organiske, tjæredannende bestanddele i filtratet før behandling med et alkalimetallalkylsulfat eliminerer agglomerering af tjære i det udfældede avoparcin-laurylsulfat-kompleks, og at der kan fås en næsten

35 kvantitativ udvinding af avoparcin ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

P A T E N T K R A V.

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et højaktivt, myceliefrit avoparcin-alkylsulfat-kompleks, som er praktisk taget frit for mørkfarvede, organiske derivater, som er
5 dannet under avoparcinfermentering, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter følgende trin:

(a) fremstilling af en fermenteringsvæske ved syrning af hele den høstede mæsk til en pH-værdi på 1,9-2,3 med en farmakologisk acceptabel syre og filtrering af den syrnede
10 mæsk til opnåelse af et syrefiltrat, som er praktisk taget frit for mycelier og uopløselige fermenteringsstoffer,

(b) tilsætning til det myceliefri syrefiltrat af 5-50 g/liter adsorberende faststoffer, som er enten et magnesium-siliciumoxid-materiale med et forhold $\text{SiO}_2:\text{MgO}$ på mellem
15 2,2:1 og 6,5:1 eller aktivt kul,

(c) omrøring af den således dannede blanding i 15-45 minutter og fraskillelse af de adsorberende faststoffer og mørkfarvede, organiske derivater fra det avoparcinholdige syrefiltrat,

(d) tilsætning til det syrnede filtrat, hvorfra de adsorberende faststoffer og de mørkfarvede, organiske derivater er fjernet, af et kompleksdannende middel valgt blandt forbindelser med formlen: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{SO}_2-\text{OM}$, hvor n er et helt tal fra 9 til 17, og M er natrium eller kalium, eller
20 blandinger deraf i en mængde på 0,5-1,5 g kompleksdannende middel pr. 1 g avoparcin,

(e) koncentrering af faststofferne i den med alkalimetallalkylsulfat behandlede, syrnede væske og fraskillelse af brugt væske fra faststofferne, der indeholder avoparcin-
30 -alkylsulfat-komplekset,

(f) behandling af de avoparcinholdige faststoffer med vandig ammoniak til indstilling af deres pH-værdi på 6,5-9,0 og derefter tørring af den fremkomne blanding til udvinding af det højaktive, myceliefri avoparcin-alkylsulfat-kompleks, som er praktisk taget frit for mørkfarvede, organiske derivater, som er dannet under avoparcinfermentering

35

gen.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, til fremstilling af et højaktivt, myceliefrit avoparcin-alkylsulfat-kompleks, ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den høstede
5 helmask indstilles på en pH-værdi på 1,9-2,3 med svovlsyre.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at adsorptionsmidlet er attapulgit, magnesium-trisilicat eller et syntetisk, hydratiseret magnesium-siliciumoxid-materiale med en gennemsnitlig partikelstørrelse
10 på 2-15 μm , og at alkalimetalkylsulfatet er natriumlaurylsulfat.