(19) DANMARK

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) 145063 B

(21) Ansøgning nr. 2320/78
(22) Indleveringsdag 25. maj 1978
(24) Løbedag 25. maj 1978
(41) Alm. tilgængelig 2. dec. 1978
(44) Fremlagt 16. aug. 1982
(86) International ansøgning nr. -
(86) International indleveringsdag -
(85) Videreførelsesdag -
(62) Stamansøgning nr. -
(30) Prioritet 1. jun. 1977, 802499, US

(51) Int.Cl.³ C 12 P 21/00
C 07 G 11/00

(71) Ansøger PFIZER INC., New York, US.

(72) Opfinder Walter Daniel Celmer, US: Walter Patrick Cullen, US: Charles Edward Moppett, US: John Broderick Routien, US: m. fl.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Hofman-Bang & Boutard.

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et antibioticum kaldet For= bindelse 46192.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af et hidtil ukendt antibioticum, kaldet Forbindelse 46192, tilhørende gruppen af svovlholdige polypeptider. Denne familie af antibiotica inkluderer thiostrepton (Antibiotics Ann., 1955-1956, 554-559); siomycin (J. Antibiotics, 14:255, 1961); A-59 (J. Antibiotics, A14:194, 1961); thiopeptin (J. Antibiotics, 23:113-119, 1970); og sporangiomycin (J. Antibiotics, 21:525-531, 1968).

Det har ifølge opfindelsen vist sig, at dette hidtil ukendte antibioticum produceres af enhver af to stammer af en hidtil ukendt underart af Streptosporangium under submerse aerobe betingelser

DK 145063 B

i vandige næringsmedier, og i overensstemmelse hermed er fremgangsmåden ifølge opfindelsen ejendommelig ved det i kravets kendetegnende del anførte.

Forbindelse 46192 er aktiv overfor en række forskellige mikroorganismer og har den virkning at forbedre fodereffektiviteten hos drøvtyggere.

De antibioticumproducerende mikroorganismer, som anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er isoleret fra jordprøver i Canada og Frankrig og fandtes ved undersøgelse at have de morphologiske træk, som er karakteristiske for en Streptosporangium. Denne slægt skelnes fra andre tilhørende gruppen af actinomyceter ved dannelsen af snoede kæder af runde til elliptiske sporer indeholdt i sporangier og dannelsen af luftmycelium på kulturens overflade.

De to stammer af Streptosporangium, Pfizer F.D. 25824 og Pfizer F.D. 25898, er blevet deponeret i The American Type Culture Collection, Rockville, Md. under accessionsnumrene ATCC 31265 og ATCC 31266.

Begge kulturer blev præpareret til udplantning på medier ved den metode, som er beskrevet i Inter. Jr. Sys. Bacteriology 16(3):322, 1966. Inkubationstemperaturen var 28°C. Aflæsninger af resultater blev foretaget ved intervaller op til 21 dage. Kulturernes farver blev bestemt ved sammenligning med mærkater fra the Color Harmony Manual, fourth edition, såvel som personlige beskrivende vendinger.

De til karaterisering af kulturerne anvendte identifikationsmedier og referencer for deres sammensætning er som følger:

1. Trypton - gærekstrakt - væske (ISP No. 1 - Difco)
2. Gærekstrakt - maltekstrakt - agar (ISP No. 2 - Difco)
3. Havremel - agar (ISP No. 3 - Difco)
4. Uorganiske salte - stivelse - agar (ISP No. 4 - Difco)
5. Glycerol - asparagin - agar (ISP No. 5 - Difco)
6. Pepton - gærekstrakt - jern - agar (ISP No. 6 - Difco)
7. Tyrosin - agar (ISP No. 7 - Difco)

8. Dextrose - nitrat-væske - S.A. Waksman, The Actinomyceres, vol. 2, medium 1, side 328, 1961, med 3 g dextrose i stedet for 30 g sucrose og agar udeladt.
9. Organisk nitrat - væske - R.E. Gordon and J.M. Mihm. Jr. Bac 73: 15-27, 1957.
10. Gelatine - Ibid.
11. Stivelse - Ibid.
12. Skummetmælk - Difco.
13. Ledningsvand - agar.
14. Glucose - asparagin - agar - S.A. Waksman, op. cit. medium 2, side 328.
15. Czapek - sucrose - agar - Ibid, medium 1, side 328.
16. Emerson's agar - Ibid, medium 28, side 331.
17. Næringsagar - Ibid, medium 14, side 330
18. Calciummalat - agar - S.A. Waksman, Bact. Rev. 21:1-29, 1957.
19. Cellulose
    a) H.L. Jensen, Proc. Linnean Soc. N.S. Wales 55:231-248, 1930
    b) M. Levine and H.W. Schoenlein, A Compilation of Culture Media, medium 2511, 1930.
20. Carbonhydrater - G.M. Luedemann and B.C. Brodsky, Antimicrobial Agent and Chemotherapy 1964: 47, 1965.

Kulturerne blev karakteriseret som følger:

Gærekstrakt - maltekstrakt - agar - Vækst moderat til god, hævet, farveløs til lyst rødlig (6 1/2 gc og 6 1/2 le) med hvidt luftmycelium, som bliver lyserødt i løbet af 21 dage; underside hvid til lyserød; blegt lyserødt opløseligt pigment i løbet af 21 dage.

Havremel - agar - Vækst ringe til moderat, flødefarvet til blegt lyserød (6 ca) viser sig som små isolerede kolonier med fløjlsagtig overflade, luftmycelium kontinuert hele vejen eller ringlignende; underside flødefarvet til blegt lyserød; blegt lyserødt opløseligt pigment.

Uorganiske salte - stivelse - agar - Vækst ringe til moderat, blegt lyserød eller farveløs (5 ca til 6 ca), luftmycelium ringlignende; underside som overfladen; intet opløseligt pigment.

Glycerol - asparagin - agar - Vækst ringe, små isolerede prikker, hvid; underside farveløs til flødefarvet; intet opløseligt pigment.

Czapek - sucrose - agar - Vækst ringe, blegt lyserød (6 ca) til hvid, små isolerede prikker; underside hvid; intet opløseligt pigment.

Glucose - asparagin - agar - Vækst ringe til moderat, hvid, svagt hævet, glat med lidt luftmycelium; undersiden har samme farve som overfladen; intet opløseligt pigment.

Næringsagar - Vækst ringe til moderat, blegt gullig, hævet, svagt rynket, med lidt hvidt eller intet luftmycelium; undersiden har samme farve som overfladen; intet opløseligt pigment.

Emerson's agar - Vækst moderat, blegt gullig, stærkt hævet, rynket, intet luftmycelium eller små områder med hvidt luftmycelium; undersiden har samme farve som overfladen; intet opløseligt pigment.

Stivelse - agar - Vækst moderat til god, hvid til blegt grålig, hævet, rynket, intet luftmycelium; underside brunlig (4 le); blegt lyserødt opløseligt pigment.

Gelatine - Vækst moderat, hvid,svagt hævet, rynket; underside gullig brun (3 ic); meget blegt lyserødt til intet opløseligt pigment.

Calciummalat - agar -Vækst ringe, hvid til blegt lyserød (nær 6 ca) viser sig som små isolerede prikker; underside farveløs; intet opløseligt pigment.

Tyrosin - agar - Vækst ringe til moderat, hvid til blegt lyserød, viser sig som små isolerede prikker; lyserødt opløseligt pigment.

Ledningsvand - agar - Hvide til blegt lyserøde små prikker; undersiden har samme farve som overfladen; intet opløseligt pigment.

Sporangier og sporer (fra Czapek sucrose - agar) - Sporangier mest runde, 6,5-10 (mest 7-8) µm i diameter, på lange 3-14 µm sporangiophorer; sporer runde til bredt elliptiske, mest 2,2 x 1,6 µm, men varierende fra 1,6-2,7 x 1,1-1,2 µm, eller runde, 2,2 µm i diameter; ikke-motile.

Biokemiske egenskaber - Der produceres intet melanin; intet H_2S; gelatine smeltes; stivelse hydrolyseres meget svagt; nitrater reduceres; vækst på Jensens cellulose, men ingen nedbrydning og ingen vækst på Levine og Schoenleins cellulose; ingen virkning på mælk; calciummalat hydrolyseres ikke.

Carbonudnyttelse - Udnyttes: glucose, cellobiose, fructose, galactose, inositol, mannose, rhamnose, ribose, stivelse, trehalose, xylose; udnyttes ikke: adonitol, arabinose, dulcitol, glycerol, lactose, mannitol, melezitose, raffinose, sorbitol, sorbose, saccharose; variabelt for de to stammer: melibiose, salicin.

De to kulturer blev også dyrket på nogle få medier som skitseret af J.N. Couch, Jr. Elisha Mitchell Soc. 79:53-70 1963 og også prøvet for vækst ved forskellige temperaturer på ATCC medium No. 172. Resultaterne var som følger:

Czapek - sucrose - agar - Kolonier 8-11 mm brede i løbet af 4-5 uger, flade, tynde, med frynsede radiale linier af lyserødt luftmycelium ved kanten eller med krans af undertrykt blegt lyserødt mycelium; luftmycelium Hydrangea Pink til Pale Congo Pink (Ridgway).

Pepton - czapek - agar - Kolonier 10-15 mm brede, flade til svagt hævede, lidt ru i den centrale del, men med flad ydre del, kant regelmæssig, mest nøgen, Olive Buff til Pale Olive Buff (Ridgway), noget hvidt luftmycelium nær kanten; opløseligt pigment meget blegt lyserødt til lyserødt-vinrødt.

Kartoffel - dextrose - agar - Kolonier 10-15 mm brede, hævede, noget ru, dækket med hvidligt til lyserødt luftmycelium (Pale Congo Pink - Ridgway), kanten hel; lysebrunt opløseligt pigment.

Emerson's agar - Kolonier 12-17 mm brede; hævet mærkbart, uregelmæssigt ru over hele overfladen, kanten uregelmæssig, nøgen, farven nær Deep Olive Buff (Ridgway).

Temperaturforhold

42°C	37°C	28°C	21°C
ingen vækst	god vækst	god vækst	god vækst

De to hidtil ukendte kulturer af Streptosporangium blev sammenlignet med de nært beslægtede Streptosporangium roseum ATCC 12428 og S. vulgare subsp. antibioticum ATCC 21906. De to hidtil ukendte kulturer fandtes at være forskellige fra S. vulgare subsp. antibioticum ATCC 21906, men at ligne S. roseum ATCC 12428 i mange henseender. På ISP medium 2, ISP medium 3, ISP medium 5, tyrosin-agar, Czapek-sucrose-agar, Czapek-pepton-agar, Emerson's agar, næringsagar, ledningsvand-agar, kartoffel-gulerod-agar og calciummalat-agar lignende kolonierne af de to hidtil ukendte kulturer meget nær kolonierne af S. roseum. De to hidtil ukendte kulturer og S. roseum viste positiv stivelseshydrolyse, positiv gelatinesmeltning, positiv nitratreduktion, negativ melaninproduktion, negativ cellulosenedbrydning og det samme område for vækstemperatur. Størrelsen og formen af sporangier og sporangiosporer hos de tre kulturer var identisk. Udnyttelsesmønsteret for 7 carbonhydrater var ens hos de tre kulturer.

Kolonierne af de to hidtil ukendte kulturer var forskellige fra kolonierne af S. roseum på kartoffel-dextrose-agar og stivelse-agar og var lidt forskellige herfra på ISP medium 4, glucose-asparagin-agar og gelatine-agar. Streptosporangium roseum udnyttede arabinose, medens de to hidtil ukendte kulturer ikke gjorde det.

Det blev konkluderet på basis af kulturmæssige, morphologiske og sammenligningsdata, at de to hidtil ukendte kulturer ikke kan skelnes fra hinanden og repræsenterer en ny underart af Streptosporangium roseum. På grund af deres lyserøde farve er det foreslåede navn for de to hidtil ukendte kulturer Streptosporangium roseum subsp. incarnatum Routien subsp. nov.

Dyrkning af Streptosporangium-kulturerne finder fortrinsvis sted i næringsmedier ved en temperatur på 28-36°C og under submerse aerobe betingelser med omrøring. Næringsmedier, som er nyttige til sådanne formål, inkluderer en kilde for assimilerbart carbon, såsom sukkerstoffer og stivelse, en kilde for organisk nitrogen, såsom casein, enzymatisk nedbrudt casein, soyabønnemel, bomuldsfrømel, jordnøddemel og hvedegluten. En kilde for vækststoffer, såsom distillers solubles, fiskemel og gærekstrakt, så vel som salte, såsom natriumchlorid og calciumcarbonat, og sporminerаler, såsom jern, magnesium, zink, cobalt og mangan, kan også udnyttes med fordelagtige resultater. Hvis der opstår overdreven skumning under gæringen, kan der sættes antiskummemidler, såsom vegetabilske olier eller siliconer til gæringsmediet. Luftning af mediet i tanke til submers vækst opretholdes fortrinsvis med en hastighed på omkring 1/2 til 2 voluminer fri luft per volumen væske per minut. Omrøring kan opretholdes ved hjælp af omrørere, som alment er af den art, der anvendes inden for gæringsindustrien. Aseptiske betingelser må selvfølgelig opretholdes under overførslen af organismen og under dens vækst.

Podematerialet til fremstilling af Forbindelse 46192 kan opnås ved anvendelse af vækstmateriale fra et skråsubstrat af kulturen på et medium, såsom ATCC medium 172 (ATCC Catalogue, 10th edition, side 235, 1972). Vækstmaterialet kan anvendes til at pode enten rystekolber eller podetanke, eller alternativt kan podetankene podes fra rystekolberne. Væksten i rystekolber vil almindeligvis have nået sit maksimum på omkring 4 dage, medens podematerialet i submerse podetanke sædvanligvis vil være i den mest favorable periode på 2-3 dage. Væsentlig antibiotisk aktivitet opnås i det endelige fermentor trin på fra omkring 72 til omkring 120 timer.

Antibioticumproduktionen følges hensigtsmæssigt under gæringen ved biologisk prøvning af væksten under anvendelse af en følsom stamme af Staphylococcus aureus. Der anvendes standard-pladeprøvningsteknik, hvorved inhiberingszonen omkring en filterpapirskive mættet med væsken anvendes som et mål for antibiotisk styrke. Efter at gæringsvæsken har nået et ønsket niveau af antibiotisk styrke, isoleres antibioticummet fra enten hele væsken eller den filtrerede væske. I det sidstnævnte tilfælde fjernes myceliet ved

filtrering eller centrifugering. Forskellige typer udstyr, såsom filterpresser, centrifuger osv., kan anvendes.

Tyndtlags-chromatografi under anvendelse af silicagel er et nyttigt redskab til analyse af Forbindelse 46192 produceret sammen med et antal mindre betydende antibiotiske komponenter i gæringsmedier og sammensætningen af rå og rensede materialer extraheret fra gæringsvæsker. Adskillelsen af komponenterne i den antibiotiske blanding er i vigtig grad afhængig af systemets antibioticumindhold. For lidt antibiotisk styrke fører til, at mindre betydende antibiotiske komponenter ikke afsløres; for megen antibiotisk styrke resulterer i en medslæbsvirkning, som fører til for dårlig adskillelse.

Udviklingssystemet for tyndtlags-chromatografi er chloroform/acetone i volumenforholdet 3:1. De antibiotiske stoffer kan synliggøres ved udsættelse for 254 nm lys, sprøjtning med vand for at finde vandafvisende pletter eller overhældning med agar podet med en følsom stamme af Staphylococcus aureus.

Komponenterne i den antibiotiske blanding kan adskilles og udvindes fra gæringsvæsken ved opløsningsmiddelextraktion, modstrømsfordeling, adsorption, søjlechromatografi eller kombinationer deraf. De antibiotiske stoffer kan extraheres fra hel væske ved et pH område på 4,0-10,0 under anvendelse af et organisk opløsningsmiddel, såsom butanol, pentanol, ethylacetat, methylisobutylketon og andre beslægtede med vand ublandbare opløsningsmidler. Opløsningsmidlet koncentreres derpå under vacuum, og de antibiotiske stoffer udfældes ved tilsætning af et ikke-opløsningsmiddel, såsom n-heptan.

En metode til udskillelse og udvinding af Forbindelse 46192 er som følger: Hel gæringsvæske indstillet til pH ca. 5,0 med 50% svovlsyre extraheres med methylisobutylketon. Opløsningsmidlet fjernes i vacuum. Det mørke olieagtige koncentrat udrives med heptan, diethylether og endelig med ethylacetat. Det resulterende faste stof opløses derpå i methanol og udfældes ved afkøling til opnåelse af et næsten hvidt pulver. En portion af dette pulver opløst i chloroform chromatograferes på silicagel, fortrinsvis "si-

lica gel 60" (forhandlet af E. Merck, Darmstadt, BRD) og elueres med chloroform indeholdende stigende mængder af methanol op til et maksimum på 3% methanol-97% chloroform. Disse fraktioner, som er rige på Forbindelse 46192, renses yderligere ved præparativ tyndtlags-chromatografi ("silica gel PF-254" forhandlet af E. Merck, Darmstadt, BRD) udvikles og elueres med ethylacetat. Forbindelse 46192 krystalliserer fra methanol. Alle trin i rensningssekvensen kontrolleres ved tyndtlags-chromatografi ("Analtech silica gel Gf", chloroform/acetone, 3:1). Forbindelse 46192 synliggøres ved (a) udsættelse for 254 nm ultraviolet lys, (b) biooverlag under anvendelse af en agarsuspension indeholdende en følsom stamme af Staphylococcus aureus eller (c) sprøjtning med vand for at finde vandafvisende pletter.

Den krystallinske form af Forbindelse 46192 har et smeltepunkt på 210-216 °C, er opløselig i chloroform, ethylacetat og methylisobutylketon og uopløselig i heptan, har absorptionsmaxima i ethanol i spektrets ultraviolette område ved 238 og 300-305$_{sk}$nm med $E_{1\ cm}^{1\%}$ værdier på henholdsvis 350 og 80, har den gennemsnitlige vægtmæssige sammensætning 48,49% carbon, 5,05% hydrogen, 13,03% nitrogen, 10,88% svovl og 22,55% oxygen (som forskel), har en optisk drejning på $[\alpha]_D$= -129° ved en koncentration på 1% i chloroform og udviser, pelleteret i KBr, karakteristisk absorption i det infrarøde område ved de følgende bølgelængder i µm: 2,97, 5,77, 6,02, 6,30, 6,6-6,75, 7,25, 8,25, 9,75 og 11,20.

Forbindelse 46192 er aktiv overfor en række forskellige Gram-positive bakterier som belyst i tabel I.

TABEL I

Organisme	Minimal inhiberende koncentration (µg/ml)
Staphylococcus aureus sp.	<0,10
Bacillus subtilis	<0,10
Streptococcus pyogenes	<0,10
Streptococcus faecalis	<0,10
Clostridium sp.	<0,12-3,12

Signifikant beskyttelse ydes mus, som er eksperimentelt inficeret med Staphylococcus aureus 01A005, af Forbindelse 46192 i doser på 50-200 mg/kg og en oral dosis på 200 mg/kg.

Rå antibiotiske blandinger, såsom de der opnås direkte fra væsken eller i ethvert af de mellemliggende udvindingstrin, såvel som renset Forbindelse 46192 kan anvendes til behandling af antibioticum-følsomme infektioner hos mennesker og dyr i parenterale doser på 200 til 1000 mg, afhængigt af infektionens type og alvor og det behandlede individs vægt. Opløsninger af Forbindelse 46192 i sesamolie, jordnøddeolie og/eller propylenglycol i koncentrationer på 200-500 mg/ml kan anvendes til subcutan eller intramuskulær indgivning. Forbindelsen kan også indgives til dyr med dets foder bestående af sædvanlige foderingredienser, såsom majs og sojabønnemel.

Virkningen af vækstfremmende midler i dyrefoder er almindeligvis blevet bestemt ved direkte dyrefodring. GB patentskrift nr. 1 197 826 beskriver i detaljer en in vitro teknik til bestemmelse af mulig vækstfremmende aktivitet hos drøvtyggere. Prøvningsmetoden indebærer anvendelsen af et apparat, hvori drøvtyggernes fordøjelsesprocesser gennemføres og studeres in vitro. Dyrefoderet, vommateriale og forskellige vækstfremmende midler indføres i og udtages fra en laboratorieenhed under omhyggeligt kontrollerede betingelser, og de ændringer der finder sted studeres kritisk og fortløbende, medens den mikrobielle flora i vomindholdet forbruger foderet. En forøgelse i propionsyreindholdet i vomvæsken viser, at det vækstfremmende middel i fodersammensætningen har medført en ønsket reaktion i vommens samlede funktion. Ændringen i propionsyreindholdet udtrykkes som procent af det propionsyreindhold, som findes i kontrolvomvæsken. Langvarige in vivo foderundersøgelser anvendes til at vise en pålidelig korellation mellem propionsyreforøgelse i vomvæsken og forbedret virkning på dyr.

Vomvæske opsamles fra en fistuleret ko, som fodres på en kommerciel opfedningsration plus hø. Vomvæsken filtreres umiddelbart igennem et osteklæde, og 10 ml sættes til en 50 ml konisk kolbe indeholdende 400 mg standard substrat (68% majstivelse + 17% cellulose + 15% extraheret sojabønnemel), 10 ml af en pH 6,8 puffer og prøve-

forbindelsen. Kolberne gennemskylles med oxygenfrit nitrogen i omkring 2 minutter og inkuberes i et rystevandbad ved 39°C i omkring 16 timer. Alle prøvninger gennemføres tredobbelt.

Efter inkubering blandes 5 ml af prøven med 1 ml 25% metaphosphorsyre. Efter 10 minutter tilsættes 0,25 ml myresyre, og blandingen centrifugeres ved 1500 omdr./min. i 10 minutter. Prøver analyseres derpå ved gas-væske-chromatografi ifølge den metode, som er beskrevet af D.W. Kellog i J. Dairy Science 52, 1690 (1969). Maksimumshøjder for eddikesyre, propionsyre og smørsyre bestemmes for prøver fra ubehandlede og behandlede inkubationskolber. Resultaterne er anført i tabel II.

TABEL II

Koncentration af forbindelse 46192 (ppm)	Propionsyre (%) *
20	165
10	159
5	163

* Ubehandlet kontrol = 100%

På basis af disse data kan det udledes, at forbedret foderudnyttelse hos drøvtyggere, såsom kvæg og får, og enmavede dyr, såsom heste, svin og kaniner, vil opnås ved indførelse af Forbindelse 46192 i dyrefoder. Foruden ren Forbindelse 46192 og den rå isolerede forbindelse kan tørret gæringsvæske indeholdende Forbindelse 46192 inkorporeres i fodersammensætninger i den ønskede koncentration.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen belyses nærmere ved de efterfølgende eksempler.

EKSEMPEL I

Der fremstilles et sterilt vandigt medium med den følgende sammensætning:

Ingrediens	Gram/liter
Glucose	10
Stivelse	20
Enzymatisk nedbrudt casein	5
Dikaliumhydrogenphosphat	0,5
Cobaltchlorid	0,002
Calciumcarbonat	4
Kødmel	5
Gærekstrakt	5

pH 7,1-7,2

Celler fra en skråkultur af S. roseum subsp. incarnatum ATCC 31265 på ATCC medium 172 overføres til en række 300 ml kolber, som hver indeholder 50 ml af dette medium, og kolberne rystes på en rotationsryster i 3-4 dage ved 28-30°C. Aliquoter af dette vækstmateriale overføres til 300 ml kolber, som hver indeholder 100 ml af det ovennævnte sterile medium. Efter rystning i 3-4 dage ved 28-30°C overføres 5-10 volumenprocent af dette podemateriale til en 4 liters fermentor indeholdende 2 liter af det følgende sterile medium:

Ingrediens	Gram/liter
Glucose	20
Sojamel	30
Majsstøbevand	5 ml
Cobaltchlorid	0,002

pH 6,9-7,1

Gæringen gennemføres i 70-120 timer ved 30°C under omrøring ved 1700 omdr./min. og luftning med omkring et volumen luft per volumen væske per minut. Hele væsken extraheres to gange med det halve volumen methylisobutylketon efterfulgt af indstilling af pH-værdien til 5,0 med 50% svovlsyre. De kombinerede opløsningsmiddelekstrakter koncentreres i vacuum, og den antibiotiske aktivitet

udfældes ved tilsætning af flere volumener n-heptan. Det faste stof opsamles ved filtrering eller centrifugering.

EKSEMPEL II

Fremgangsmåden fra eksempel I kan gentages med tilsvarende resultater under anvendelse af Streptosporangium roseum subsp. incarnatum ATCC 31266 i stedet for Streptosporangium roseum subsp. incarnatum ATCC 31265 og et gæringsmedium med den følgende sammensætning:

Ingrediens	Gram/liter
Glucose	10
Stivelse	20
Gærekstrakt	5
Enzymatisk nedbrudt casein	5
Cobaltchlorid	0,002
Calciumcarbonat	1

pH 6,9-7,1

Hele gæringsvæsken inddampes til tørhed, fortrinsvis ved sprøjtetørring.

EKSEMPEL III

En gæring i stor målestok blev gennemført under anvendelse af podematerialet og produktionsmediet fra eksempel I. En 190 liters fermentor indeholdende 95 liter af produktionsmediet fra eksempel I blev podet med 5 volumenprocent podemateriale af S. roseum subsp. incarnatum ATCC 31265 og derpå kørt i 5 dage ved 30°C med en luftningshastighed på 1 volumen luft per volumen væske per minut. 95 liter hel gæringsvæske blev extraheret med 30 liter methylisobutylketon efter indstilling til pH 5 med 50% svovlsyre. Opløsningsmidlet blev fjernet i vacuum og efterlod en mørk olie. Denne blev udrevet i rækkefølge med 250 ml heptan, 50 ml diethylæter og derpå med 25 ml ethylacetat. Det resulterende faste stof blev derpå opløst i methanol og udfældet ved afkøling til opnåelse af 1,77 g af et næsten hvidt pulver. En portion af dette pulver (1,50 g)

blev opløst i chloroform og chromatograferet på en søjle indeholdende tilnærmelsesvis 230 g "silica gel 60" under udvikling og eluering med chloroform indeholdende stigende mængder af methanol op til et maksimum på 3% methanol/97% chloroform. De fraktioner, som var rige på Forbindelse 46192, blev yderligere renset ved præparativ tyndtlags-chromatografi under anvendelse af "silica gel PF_{254}". Det materiale, som blev opnået ved eluering med ethylacetat, blev krystalliseret fra methanol, smp. 210-216°C.

Forbindelse 46192 er opløselig i chloroform, ethylacetat og methylisobutylketon, delvis opløselig i methanol og uopløselig i heptan.

Fuldstændig sur hydrolyse af Forbindelse 46192 viser tilstedeværelsen af threonin og flere uidentificerede aminosyrer. ^{13}C-NMR-spektret ($CDCl_3$) antyder tilstedeværelsen af omkring 73 carbonatomer.

Analyse giver de følgende procentforhold:

Carbon	48,49
Hydrogen	5,05
Nitrogen	13,03
Svovl	10,88
Oxygen (som forskellen)	22,55

Forbindelse 46192 er optisk aktiv med en drejning på $[\alpha]_D = -129^0$ ($c = 1,0$, $CHCl_3$).

De ultraviolette absorptionsmaxima i ethanol er som følger:

λ^{max} 238
300-305$_{sk}$ nm

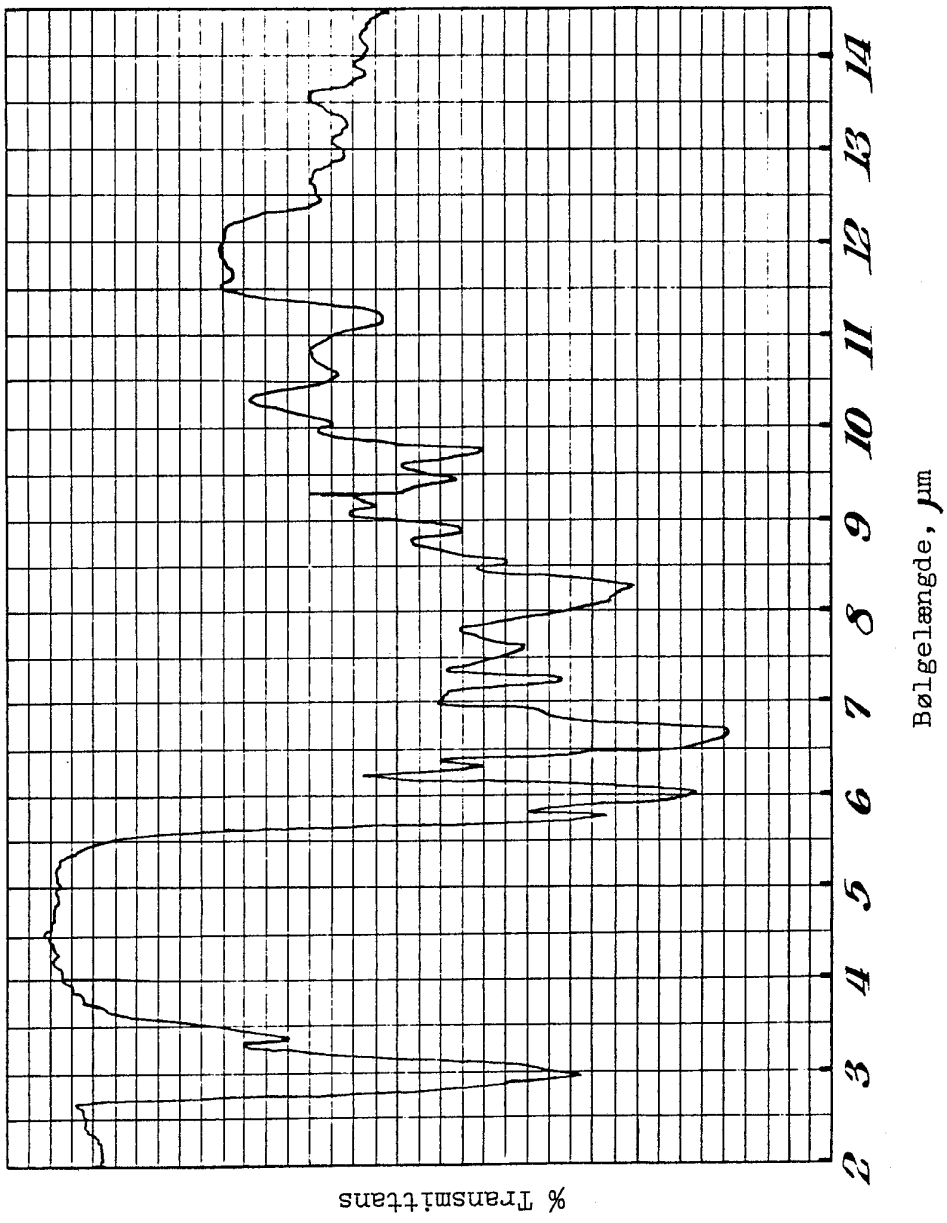
$E^{1\%}_{1\ cm}$ 350
80

Forbindelse 46192's infrarøde spektrum er vist på tegningen. En kaliumbromidpille viser karakteristisk absorption i det infrarøde område ved de følgende bølgelængder i µm: 2,97, 5,77, 6,02, 6,30, 6,6-6,75, 7,25, 8,25, 9,75 og 11,20.

P a t e n t k r a v :

Fremgangsmåde til fremstilling af et antibioticum, kaldet Forbindelse 46192, k e n d e t e g n e t ved, at Streptosporangium roseum subsp. incarnatum Routien ATCC 31265 eller Streptosporangium roseum subsp. incarnatum Routien ATCC 31266 dyrkes under submerse aerobe betingelser i et vandigt næringsmedium indeholdende assimilerbare kilder for carbon og nitrogen, hvorefter den antibiotiske forbindelse udvindes derfra.

Fremdragne publikationer:


% Transmittans
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
Bølgelængde, µm