

C12d 9/18



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 46572

Kl. 6 b, 16/03

Kl. internat. C 12 d

Chinoin Gyógyszer-és Vegyészeti Termékek Gyára rt.

Budapeszt, Węgry

Sposób wytwarzania tetracykliny

Patent trwa od dnia 2 lipca 1959 r.

Pierwszeństwo: 24 lipca 1958 r. (Węgry)

Tetracyklinę proponowano wytwarzać na drodze chemicznej albo fermentacyjnej. Spośród licznych sposobów fermentacyjnego wytwarzania tego antybiotyku znane jest poddawanie fermentacji szczepu *Streptomyces Aureofaciens* albo innych szczepów, które pierwotnie wytwarzają chlorotetracyklinę. W celu niedopuszczenia do powstawania podczas fermentacji chlorotetracykliny stosowano dotychczas dwie metody, albo fermentację prowadzono na pożywce wolnej od chlorków albo do środowiska fermentacyjnego wprowadzano homologi halogenków, które zapobiegały chlorowaniu tetracykliny.

W sposobie według wynalazku stosuje się nowy szczep stanowiący mutantu *Streptomyces Aureofaciens*, który posiada właściwość wytwarzania ponad 90% tetracykliny.

W celu uzyskania tego mutantu, szczep *Streptomyces Aureofaciens* poddaje się w podanej kolejności naświetlaniu promieniami ultrafioletowymi o 25000 erg/mm² w ciągu mniej więcej 18 minut, naświetlaniu promieniami Rentgena o 40000 r w ciągu 5 godzin, ponownie naświetlaniu promieniami ultrafioletowymi o 5000 erg/mm² w ciągu 2 godzin w obecności roztworu zawierającego 8—15 g/ml rodanku benzylu i w ciągu 23 minut promieniami Rentgena o 18000 r, następnie silnie oziębia do temperatury od —3 do —15°C, traktuje streptomycynę w roztworze 0,5% wym. inkubuje na syntetycznej pożywce, traktuje koenzymem A, w ilości 1 mg/ml w roztworze 0,05 mola NaHCO₃, znowu naświetla promieniami Rentgena o 6000 r w ciągu 8 minut w obecności 0,005 mola cyjanku potasu i z otrzymanym mutantem CDSD — 314 ewentualnie z jego szczepami dziedzicz-

nyrn lub mutantami przeprowadza w znany sposób fermentację w pożywce zawierającej jony chloru.

Poniższa tablica podaje właściwości szczepu wyjściowego (oznaczonego LSZ 536) i nowego szczepu (oznaczonego CDSD 314):

Pożywka	Rozwój	Tworzenie sporów	Tworzenie pigmentu	Micella powietrza	Rozwój	Tworzenie sporów	Tworzenie pigmentu	Micella powietrza
sacharoza asparagina agar	dobry	dobrze	czerwony	szara	dobry	dobrze	żadne	biała
sacharoza czapek Dox	słaby	słabe	żadne	szaro-biała	dobry	dobrze	żadne	biała
agar ekstrakt kartoflany	średnio dobry	średnie	czerwono-brunatny	szaro-szara	dobry	dobrze	żadne	biała
gliceryna z ekstraktem drożdżowym	dobry	średnie	żadne	żółto-brunatna	słaby	słabe	żadne	żółta
papka kukurydziana gliceryna	dobry	dobrze	żadne	żółta	słaby	słabe	żadne	żółta biała
papka kukurydziana	Całkowita produkcja antybiotyku E/ml							
skrobia								
NH ₄ NO ₃	980				1850			
CaCO ₃	Produkcja tetracykliny w ‰							
	<3				91			

Obydwa szczepy wykazują także różną zdolność rozkładania cukrów, co widoczne jest z poniższej tablicy.

Rodzaj cukru	LSZ 536	CDSD 314
glukoza	+	+
fruktoza	+	+
sacharoza	+	+
maltoza	—	+
magnosa	+	+
mannit	—	+
laktoza	—	+
galaktoza	—	+
ksylloza	—	+

Spory i sporofory wyjściowego szczepu są szare, przy czym sporofory rozwijają się w kształcie otwartych, prostych spiral. Nowy szczep CDSD 314 daje haczykowato zakrzywione sporofory, oraz białe spory i sporofory.

Nowy szczep uznano na podstawie systemu Pridhama i współpracowników (Appl. Microbiol. 6, 52, 1958) jako pierwszą serię przynależną do grupy „Petinaculum apertum” (White series”), podczas gdy szczep wyjściowy należy do szóstej serii („gray series”).

Fermentację szczepu przeprowadza się najkorzystniej w napowietrzanej kulturze głębinowej. Można stosować znane pożywki, tak o pożywki zawierające chlorki.

Produkt otrzymany na drodze fermentacji z nowym szczepem można stosować bez dalszego oczyszczania do celów paszowych. W tym przypadku sfermentowany materiał korzystnie najpierw zagęszcza się. Produkt fermentacji można również przerabiać i oczyszczać dowolnymi znanymi metodami przy otrzymywaniu tetracykliny. Szczególnie korzystny jest następujący sposób. Ciężar fermentacyjną odosłano się w środowisku kwaśnym od micel, po czym

po odpowiednim zalkalizowaniu ($\text{pH} = 8-9$) traktuje czwartorzędową zasadą amoniową albo jej solą. Wydzieloną przy tym czwartorzędową sól tetracykliny odsąca się i po wypłukaniu rozkłada kwasem w środowisku wodnym. Po usunięciu zanieczyszczających jonów żelaza i wapnia ekstrahuje się z przesączu tetracyklinę za pomocą rozpuszczalnika organicznego, korzystnie alkoholu np. butanolu. Otrzymuje się ekstrakt alkoholowy, który następnie ekstrahuje się kwaśną wodą zawierającą chlorek żelazowy. Tetracyklina tworzy z żelazem kompleks, który jest rozpuszczalny w wodzie, wobec czego wydajność tej ekstrakcji wynosi powyżej 95%. Kompleks tetracykliny z żelazem rozkłada się następnie za pomocą siarczynu alkalicznego albo sposobem według wynalazku za pomocą borowodorunku, najkorzystniej borowodorunku sodowego. Następnie wodny ekstrakt zagęszcza się, po czym otrzymuje się tetracyklinę w postaci soli albo po zakwaszeniu jako kryształki w postaci dwuwodzianu.

Otrzymany dwuwodzian tetracykliny nadaje się do celów farmaceutycznych i odpowiada wymaganiom farmakopealnym.

Z roztworu tetracykliny albo z dwuwodzianu tetracykliny można wytwarzać w pożądanym przypadku dowolną sól tetracykliny, przy czym z ługów macierzystych można otrzymać jeszcze dalsze ilości tego antybiotyku.

Przykład I. 100 ml podłoża inoculum zaszczepla się w 500 ml kolbie Erlenmeyera 1 ml zawiesiny spor szczepu CDSD-314 przechowywanego w temperaturze 10°C i kulturowe przez 48 godzin na wstrząsarce przy 25°C . Dobrano następujący skład pożywki: 2% skrobi, 2% namoku kukurydzianego (w przeliczeniu na suchą substancję), 0,4% węglanu wapniowego, 0,2% oleju palmowego. Wartość pH po sterylizacji = 6,6 — 6,8, temperatura 25°C .

100 ml pożywki w kolbie Erlenmeyera o pojemności 500 ml zaszczepla się 2 ml otrzymanego inoculum i poddaje fermentacji przez 96 godzin w temperaturze 25°C . Skład pożywki: 2,5% skrobi, 0,6 namoku kukurydzianego (w przeliczeniu na suchą substancję), 0,5% NH_4NO_3 , 0,4% CaCO_3 , 0,2% KNO_3 i 0,3% oleju palmowego. Po sterylizacji wartość pH wynosi 6,1—6,3.

Zawartość antybiotyku ustalono począwszy od 40 godzin fermentacji.

40 godzina	64 godzina	88 godzina
zawartość antybiotyku		
E/ml	1260	1852
tetracyklina %	—	91,5
		90,6

Stosunek tetracykliny do chlorotetracykliny, który np. w 64 godzinie fermentacji wynosił 91,5:8,5, ustalono za pomocą chromatografii na bibule.

Dalej postępuje się jak w przykładzie IV. **Przykład II.** 100 ml pożywki zaszczepla się w 500 ml kolbie Erlenmeyera 2 ml 48-godzinnej kultury otrzymanej z pożywki inoculum i fermentuje przez 88 godzin na wstrząsarce w temperaturze 25°C . Skład pożywki: 2% skrobi, 1% mąki z orzeszków Aszanti, 0,3% namoku kukurydzianego (w przeliczeniu na suchą substancję), 0,5% NH_4NO_3 , 0,4% CaCO_3 , 0,2% KNO_3 i 0,3% oleju palmowego. Po sterylizacji wartość pH wynosi 6,1—6,3. Zawartość antybiotyku począwszy od 40 godziny fermentacji jest następująca:

	40 godzina	64 godzina	88 godzina
zawartość antybiotyku			
E/ml	1450	2225	2100
tetracyklina %	—	92	91

Przykład III. 6 litrów pożywki inoculum (patrz wyżej) zaszczepla się 30 ml kultury CDSD-314 zmrożonej w temperaturze -10°C . Kulturę poddaje się fermentacji przy mieszaniu i napowietrzaniu przez 48 godzin. (600 obrotów/minutę), 6 litrów pożywki zaszczepla się jak w przykładzie I, 600 ml rozwiniętej kultury, po czym poddaje fermentacji w temperaturze 25°C napowietrzając 6 litrami powietrza/minutę.

Otrzymuje się następujący wynik:

	36 godz.	40 godz.	46 godz.	52 godz.
zawartość antybiotyku				
E/ml	724	1289	1587	1905
tetracyklina %	72,4	88	90	91,5

Przykład IV. 10 litrów cieczy fermentacyjnej (1300 E/ml 90,5 zawartość tetracykliny) zakwasza się 10 n H_2SO_4 do wartości $\text{pH} = 2,5$. Ciecz przesąca się, następnie dodaje się 150 ml 10%-owego wodnego roztworu bromku cetylopirydyniowego, po czym wartość pH nastawia się na 9 za pomocą 5-nego wodorotlenku sodowego. Wytrąconą czwartorzędową sól odsąca się, przemycwa wodą, po czym sporządza się zawiesinę z 300 ml wody, której wartość pH nastawia się na 1,8 za pomocą kwasu

szczawliowego. Po odsączeniu osad przemywa się 150 ml 0,01 n HCl. Połączone przesącze zadaje się 45 g chlorku sodowego i ekstrahuje n-butanolem. Połączone ekstrakty butanolowe ekstrahuje się roztworem chlorku żelazowego w 0,05%-owym kwasie solnym (3 razy po 150 ml). Wodne ekstrakty łączy się, roztwór alkalinizuje się 2 n NH_4OH do pH = 3,5, po czym dodaje się borowodoru sodowego, aż do uzyskania jasno-żółtawego zabarwienia. Następnie wartość pH nastawia się na 6 i roztwór zagęszcza się do połowy objętości w próżni w temperaturze 40°C. Po 24 godzinnym odstaniu w temperaturze 5°C odsącza się wydzielone kryształy, przewywa małą ilością wody destylowanej i zimnego alkoholu i suszy w próżni. Otrzymuje się 6,5 g wodzianu tetracykliny, wykazującego aktywność 870 E/mg. W produkcie stwierdzono na podstawie chromatografii na bibule najwyżej 3% chlorotetracykliny.

Wodzien tetracykliny rozpuszcza się przy pH = 2 w kwasie solnym, roztwór liofilizuje, po czym otrzymuje się bardzo czysty chlorowodorek tetracykliny. Podobnie po zastosowaniu odpowiednich kwasów względnie zasad można otrzymać najróżniejsze sole tetracykliny. Sole tetracykliny można także wytworzyć w taki sposób, że wodny roztwór tetracykliny w odpowiednim kwasie ekstrahuje się słabo polanym rozpuszczalnikiem (np. n-butanolem), a wyosobnioną fazę rozpuszczalnika zagęszcza się w próżni, przy czym krystalizuje z dobrą wydajnością sól tetracykliny.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania tetracykliny na drodze fermentacji głębinowej za pomocą mikroorganizmu z gatunku *Streptomyces aureofaciens*

zdolnego do wytwarzania chlorotetracykliny, znamieny tym, że szczep *Streptomyces aureofaciens* w celu uzyskania mutantu poddaje się w podanej kolejności naświetlaniu promieniami ultrafioletowymi o 25000 erg/mm² w ciągu mniej więcej 18 minut, naświetlaniu promieniami Rentgena o 40000 r w ciągu 5 godzin, ponownie naświetlaniu promieniami ultrafioletowymi o 5000 erg/mm² w ciągu 2 godzin w obecności roztworu zawierającego 8—15 g/ml rodaniku benzylu i w ciągu 23 minut promieniami Rentgena o 18000 r, następnie silnie oziębia do temperatury od —8 do —15°C, traktuje streptomycyną w roztworze 0,5%-owym, inkubuje na syntetycznej pożywce traktuje koenzymem A w ilości 1 mg/ml w roztworze 0,05 mola $NaHCO_3$, znowu naświetla promieniami Rentgena o 8000 r w ciągu 8 minut w obecności 0,005 mola cyjanidu potasu i z otrzymanym mutantem CDSD-314 ewentualnie z jego szczepami dziedzicznymi lub mutantami przeprowadzona w znany sposób fermentację w pożywce zawierającej jony chloru.

2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że wyizolowaną z roztworu pofermentacyjnego tetracyklinę w postaci roztworu alkoholowego przeprowadza się przez dodanie wodnego roztworu chlorku żelazowego w związek kompleksowy żelaza, po czym przez redukcję wodorkiem boru i następnie zagęszczenie roztworu otrzymuje się krystaliczną tetracyklinę.

Chinoín Gyógyszer-és Vegyészeti
Termékek Gyára rt.

Zastępca: mgr Józef Kamiński
rzecznik patentowy

BIBLIOTEKA

Urzędu Patentowego

Główny Urząd Patentowy

WDA 100 23.11.52 100 B-3