

NORGE



STYRET
FOR DET INDUSTRIELLE
RETTSVERN

Utlegningskrift nr. 120068

Int. Cl. C 12 d 9/18 Kl. 6b-16/03

Patentsøknad nr. 139.257 Inngitt 27.II 1961

Løpedag -

Søknaden alment tilgjengelig fra 1.VII 1968

Søknaden utlagt og utlegningskrift utgitt 24.VIII 1970

Prioritet begjært fra: 8.III- og 25.III-60
Danmark, nr. 889/60, 1147/60 og 1148/60

A/S Dumex (Dumex Ltd.),
37 Prags Boulevard, København, Danmark.

Oppfinner: Knud Andersen, Birkebakken 43,
Birkerød, Danmark.

Fullmektig: Mag. scient. Per Aubert.

Fremgangsmåte til fremstilling og utvinning av
tetracyklin.

Oppfinnelsen angår en fremgangsmåte til fremstilling av tetracyklin ad mikrobiologisk vei ved podning og forgjæring av et næringssubstrat med en hittil ukjent stamme av slekten *Streptomyces*.

Oppfinnelsen angår videre egnede metoder til utvinning og rensning av det således produserte tetracyklin.

Tetracyklin, som er et bredspektret antibiotikum, ble fremstilt opprinnelig ad kjemisk vei ved katalytisk deklorering av klortetracyklin.

Det er imidlertid kostbart og besværlig å gå frem på denne måte, hvor man først må fremstille klortetracyklinet ved fermentering og deretter utvinne og rensne det, før dekloreringen kan finne sted,

120068

og man har derfor ad forskjellige veier søkt å nå frem til en fremgangsmåte ved hvilken tetracyklinet kan vinnes direkte ved fermentering.

Det er således kjent at den klortetracyklin-produserende mikroorganisme *Streptomyces aureofaciens*, som sammen med klortetracyklinet produserer en liten mengde tetracyklin, kan bringes til overveiende å produsere tetracyklin hvis man bringer klorinnholdet i næringssubstratet ned, fortrenger kloridionene med bromidioner eller tilsetter klor-eringsinhibitorer.

Disse kjente fremgangsmåter er dog ofte besværlige å gjennomføre og i utbyttmessig henseende mindre tilfredsstillende, bl.a. fordi en fjernelse eller fortrengning av kloridioner vil redusere næringsverdien av det anvendte substrat, mens inhibitorene utøver en giftvirkning overfor den anvendte mikroorganisme.

Ved anvendelse av den her omhandlede, hittil ukjente *Streptomyces*-stamme, i det følgende kalt *Streptomyces* MDA 46-6/F 93, ATCC 13938, oppnås selv i kloridrikt substrat et utbytte av antibiotika av tetracyklingruppen, som for 90-95%'s vedkommende består av tetracyklin mens bare noen få prosent er klortetracyklin, og dette forhold påvirkes ikke ved bromidtilsetning.

Oppfinnelsen vedrører altså en fremgangsmåte til fremstilling av tetracyklin ad mikrobiologisk vei ved podning og forgjæring av et næringssubstrat med en tetracyklin-produserende stamme av en *Streptomyces*-art og utvinning av det dannede tetracyklin fra det forgjærede substrat, idet fremgangsmåten er karakterisert ved at stammen *Streptomyces* MDA 46-6/F 93, ATCC 13938, dyrkes under aerobe betingelser på eller i et næringssubstrat med minst det naturlige kloridinnhold, og som inneholder en kilde for assimilerbart kullstoff og nitrogen, samt dessuten vekst-fremmende faktorer, herunder mineralsalter, hvorefter det dannede tetracyklin utvinnes av næringssubstratet.

I det følgende skal *Streptomyces* MDA 46-6/F 93, hvorav en kultur er deponert under nr. ATCC 13938 i American Type Culture Collection, Washington D.C., U.S.A., nærmere beskrives.

Streptomyces MDA 46-6/F 93 er av oppfinneren utviklet fra en *Streptomyces*-stamme som er funnet i en jordprøve av ukjent opprinnelse og deretter gjennom mange generasjoner har undergått forskjellige behandlinger, bl.a. bestråling med ultrafiolett lys, behandling med sennepsgass og radioaktiv bestråling, under stadig

120068

avprøving og utvelging med henblikk på de ovennevnte tilstrebete egenskaper, og resultatet er blitt en stamme der som nevnt på ganske avgjørende måte adskiller seg fra de hittil kjente klor-tetracyklin- eller tetracyklin-produserende Streptomyces-stammer.

Mikroskopisk morfologi.

Ved dyrking på Emersons agar dannes det rikelig mycelium i selve agaren, mens det bare dannes lite eller intet luftmycelium. Hyfene i agaren er ujevne og svakt grenet. Tykkelsen er 0,7-1,1 μ med innsnøringer og med oppsvulminger opp til 2,0 μ . Hyfespissene er i regelen rettlinjet, men det kan dog opptre enkelte hakeformede.

Ved næringssubstrater hvor luftmycelium dannes, er det temmelig løst med korte, meget skjøre sporekjeder uten spiral-dannelse. Sporene er kuleformet til sylindriske med avrundede ender, og størrelsen er 1,4 x 1,4 - 2,1 μ .

Ved neddykket vekst i et substrat med maisstøpe-vann som nitrogenkilde dannes et løst, ikke meget forgrenet mycelium med hyfetykkelser på 0,7-1,1 μ . Hyfene midt i koloniene kan være noe oppsvulmet.

Dyrkningssegenskaper.

Substrat	Vekst	Utseende og farge- stoffdannelse	Bemerkninger
Glyserol- asparagin-kjøtt- ekstraktagar	Moderat til god	Koloniene opphøyet på midten. Luftmyceliet hvitt til gulaktig. Intet fargestoff i agaren.	Baksiden samme farge
Stivelsesagar med uorganiske salter	God	Meget bred, flat vekst, dog litt opphøyet på midten. Luftmyceliet temmelig rikelig, hvitt, etterhånden brunt. Intet fargestoff i agaren.	Baksiden sortbrun.
Kalsiummalat- agar	Moderat	Koloniene noe opphøyet på midten. Orange til gul farge, intet luftmycelium, intet fargestoff i agaren.	Ytterst svak eller ingen oppløsning av kalsium- malatet
Emersons agar	God	Lys brungul farge med brune og orange pletter og sektorer. Intet luft- mycelium, intet farge- stoff i agaren.	Baksiden samme farge

120068

Substrat	Vekst	Utseende og farge- stoffdannelse	Bemerkninger
Czapek-Dox-agar med dekstrin	Moderat	Flat vekst. Hvitt luftmycelium.	Baksiden elfensben- farget
Næringsagar	Svak	Elfensbenfarge, intet luftmycelium.	Baksiden samme farge
Hickney og Tresner agar	Moderat	Flat vekst. Brungul farge, sparsomt hvitt luftmycelium som etter- hånden blir grålig-brunt idet kantene imidlertid forblir hvite.	Baksiden samme farge
Carvajal's "Oat- Meal"-agar	God	Flat vekst, svakt for- høyet midtdel. Hvitgul til strågul, midten oker- farget, randen trevlet. Hvitt luftmycelium, senere musegrått. Intet pigment i agaren.	Baksiden lys, etterhånden sort
Kasein-sojamel- agar	God	Sterkt rynket vekst med papiller i midten. Glinsende strågul, randen hel. Intet luft- mycelium. Intet pigment i agaren.	Baksiden samme farge
Lakmusmelk			Avfargning, lang- som koagulering, særere peptoni- sering med god klaring, syre- dannelse (pH 4,9)
Gelatin			Ingen smelting
Potetstykker	Kraftig	Gulaktig orangerfarge, intet luftmycelium.	

Utnyttelse av kullstoff- og nitrogenkilder.

Streptomyces MDA 46-6/F 93 kan ved dyrkning på syntetisk agar utnytte kullstoffkildene glyserol, glukose, fruktose, galaktose, mannitol, maltose, karboksymetylcellulose, cellulose, glykogen, stivelse, pektin, salisin, aeskulin, citrat, laktat, malat og succinat, men derimot ikke arabinose, dulcitol, xylose, rhamnose, sorbitol, laktose, saccarose, raffinose, dekstrin, inulin, acetat og tartrat.

120068

Ved dyrkning på syntetisk agar med glukose kan nitrogenkildene l-arginin, dl-asparaginsyre, glysin, l-histidin, l-hydroksyprolin, l-prolin, uracil, dl-treonin, dl-tryptofan, l-tyrosin, dl-valin, xantin, urinstoff og pepton utnytted, mens dl-alanin, l-asparagin, dl-cystin, l-cystein, l-glutaminsyre, dl-isoleucin, l-lysin, dl-metionin, norleucin, dl-fenylalanin, dl-serin, nitrat, nitrit og ammoniumklorid ikke gir vekst.

Sammenligning med kjente Streptomyces-arter.

Det er foretatt forsøksdyrkinger med henblikk på sammenligning mellom forskjellige kjente tetracyklin-produserende mikroorganismer, nemlig Streptomyces aureofaciens A-377 (ATCC-10762)(I), noen ikke navngitte Streptomyces stammer ATCC-11652 (2), ATCC-11653 (3) og ATCC-11654 (4), Streptomyces viridifaciens ATCC-11989 (5), Streptomyces aureofaciens HA-20 (ATCC-12416a)(6) og UV-8 (ATCC-12416c) (7), Streptomyces feofaciens S 4623/33 (8), og den her omhandlede Streptomyces MDA 46-6/F 93 (9). Resultatene er sammenstillet i nedenstående tabell.

120068

Medium	Orga- nisme	Vekst	Luftmycelium	Pigment i agar	Bakside
Glukose- asparagin- kjøttekstrakt	1	God	Rikelit, hvitt skiftende til mørkegrått	Svakt gul- aktig, opp- løselig	Gulbrun
	2	Moderat	Hvitt, skiftende til musegråsort	Gulgrønt	Orange
	3	God	Stråfarget	Gulgrønt	Brun
	4	Moderat til god	Brunlig grått	Brunlig gårtt	mørk oli- venbrun
	5	God	Musegrått	Gulgrønt	Brun
	6	God	Hvitt, skiftende til grått	Gult	-
	8	Moderat til svak	Intet	Sparsomt grønlig- brunt	-
	9	Moderat til god	Hvitt til gulaktig	Intet	Lys gul- brun
Stivelsesagar med uorganiske salter	1	God til kraftig	Hvitt, skiftende til rødlig brunt	Intet	Rødbrun
	2	Svak	Lys grøngult	Gulorange	-
	3	God	Gullig-hvitt skiftende til musegrått	Gulgrønt	-
	4	Svak	Intet	Intet	
	9	God	Hvitt, skiftende til brunt	Intet	Brunstort
Kalsiummalat- agar	1	God, Ca- malat oppløses	Sparsomt hvitt	Intet	Brungul
	2	Svak, Ca- malat oppløses	Intet	Intet	
	3	Svak, Ca- malat oppløses ikke	Sparsomt, hvitt	Intet	

120068

Medium	Orga- nisme	Vekst	Luftmycelium	Pigment i agar	Bakside
	4	Meget svak. Ca-malat opløses ikke	Intet	Intet	
	6	God, Ca- malat opløses	Kraftig, hvitt, skiftende til grått	Brunlig	
	9	Moderat Ca-malat opløses ikke	Intet	Intet	
Emersons agar	1	God	Hvitt-grått	Intet	Orange
	2	God	Ubetydelig	Orange brunt	Grønlig brungul
	3	Moderat	Hvitt-grått skiftende til brunlig	Gulbrunt	Orange- brun til gråbrun
	4	God	Intet	Blågrått	Oliven- brun
	6	God	Intet	Sparsomt	Brunlig
	7	God til kraftig	Hvitt-gult, skiftende til grått	-	Sort i gamle kulturer
	9	God	Intet	Intet	Lys brun- gul
Næringsagar	1	God	Sparsomt, hvitt-grått	Strå- farget	-
	2	Moderat	Intet	Gulaktig	-
	5	God	Intet	Rødbrunt	-
	6	God	Intet	Sparsomt brunt	Brun
	8	Moderat	Gulbrunt	Sparsomt gult	-
	9	Svak	Intet	Intet	-

120068

Ennvidere er undersøkt organismenes innvirkning på skummet melk og gelatin. Resultatene er angitt i nedenstående tabell.

Organisme		1	2	3	4	6	7	9
Skummet melk	Koagulering	-	-	-	+	-		++
	Peptonisering	-	-	-	-(+)	-	+	+
Gelatin	Oppløsning	-	+	+	+	-		-

Sammenligningene viser at *Streptomyces* MDA 46-6/F 93 vesentlig adskiller seg fra de kjente tetracyklinproduserende *Streptomyces*-arter.

Dyrkning i industriell målestokk.

Dyrkningen av *Streptomyces* MDA 46-6/F 93 foregår ialt vesentlig etter den vanligvis ved produksjon av antibiotika anvendte metode, dvs. at den dyrkes submerst under aerobe betingelser i et sterilt næringssubstrat med kilder for assimilerbart kullstoff og nitrogen samt vekststimulerende stoffer ved en passende temperatur og pH-verdi inntil en maksimal mengde tetracyklin er dannet i substratet.

Det har vist seg at man for å få rimelige utbytter ifølge oppfinnelsen skal foreta dyrkningen ved en temperatur mellom 20°C og 40°C i 20-200 timer. Maksimalt utbytte krever ennvidere at pH-verdien ifølge oppfinnelsen holdes mellom 6 og 8. Da det ved dyrkningen skjer en syredannelse, kan man for å overholde den nevnte pH-verdi tilsette en puffer, f.eks. pulverisert kritt.

Foruten de tidligere nevnte kullstoffkilder, eller eventuelt sammen med en eller flere av disse, kan forskjellige vegetabiliske fettstoffer, såsom soyaolje, jordnøttolje, palmeolje, olivenolje og bomullsfrøolje, eller animalske fettstoffer, såsom talg, utnyttes som kullstoffkilder. Ennvidere kan det anvendes frie fettsyrer, som f.eks. linolensyre, oljesyre, stearinsyre og palmitinsyre.

Nitrogenkildene kan være hydrolyserte eller uhydrolyserte vegetabiliske eller animalske proteiner, såsom soyabønnemel, jordnøttmel, annet mel av proteinrike frø, gluten og kasein. Også uorganiske nitrogenkilder kan anvendes, såsom ammoniakkforbindelser og nitrater.

120068

Et næringssubstrat som har vist seg å gi særlig god vekst og trivsel av mikroorganismen inneholder således

0,5-20% maisstøpevann, 0,2-10% stivelse, 0,07-10% jordnøttolje og fornødne mineralsalter.

Tetracyklin er et amfotert stoff med isoelektrisk punkt som ligger ved en pH-verdi av 5,5, idet det er overveiende positivt ladet ved en lavere pH-verdi og negativt ladet ved en høyere pH-verdi. Som ved andre amfotere stoffer ligger den minste oppløselighet ved det isoelektriske punkt.

Det er kjent at tetracyklin danner kompleksforbindelser med metaller av 2. gruppe i det periodiske system og med kombinasjoner av to metaller i denne gruppe, især av barium og magnesium, hvilke kompleksforbindelser kan utfelles og derfor benyttes til en rensningsprosess.

Ved tetracyklin er en rensning på denne måte imidlertid ikke særlig tilfredsstillende, idet det ved en titer i utgangsmaterialet på 1000 γ/ml gjenfinnes 300-500 γ/ml i filtratet fra fellingen, som enten går tapt eller krever ytterligere foranstaltninger for å kunne utvinnes.

Det har nå vist seg at tetracyklin med salter av barium og mangan danner kompleksforbindelser som er tungtoppløselige i pH-området fra 6,5 - 10,5, og ifølge oppfinnelsen utvinnes og renser man derfor tetracyklin av en vandig oppløsning ved felling med et salt av barium sammen med et salt av mangan.

Under forøvrig like forhold er denne felling langt mer effektiv enn den tidligere anvendte felling med en kombinasjon av barium- og magnesiumsalt, idet oppløsningens titer, f.eks. ved en pH-verdi på 7 ved felling av tetracyklin på den her omhandlede måte kan bringes ned til 100 γ tetracyklin pr. ml eller mindre mot som ovenfor nevnt 300-500 γ pr. ml ved barium-magnesium-felling.

Anvendelsen av mangan ved fellingen har ennvidere den fordel at manganet ikke inaktiverer tetracyklinet, det er ugiftig og det utfelles ikke i vesentlig grad ved tetracyklinets isoelektriske punkt.

Dessuten feller kombinasjonen av barium- og mangansalt tetracyklinene temmelig uavhengig av sammensetningen av det næringssubstrat som er anvendt ved dyrkningen.

På grunn av den lille oppløselighet av det utfelte kompleks kan fellingen skje selv i væsker med meget liten konsentrasjon av tetracyklinet, ifølge oppfinnelsen således i det for

120068

mycelium befridde vandige gjæringssubstrat. Det er således ikke nødvendig først å foreta en konsentrering. Fjernelsen av myceliet kan f.eks. skje ved filtrering eller ved at pH-verdien i det forgjærte substrat innstilles på ca. 2, hvorefter myceliet frasentrifugeres.

For at fellingen skal bli så effektiv som mulig tilsettes de anvendte salter i overskudd, men på grunn av tungtoppløseligheten av det dannede kompleks kan man nøye seg med relativt små salttilsetninger, hvilket innebærer økonomiske fordeler. Man kan således oppnå en felling ved tilsetning av en saltmengde som mol for mol svarer til tetracyklininnholdet, dvs. ca. 0,5 g $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ og 0,5 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ pr. g tetracyklin i oppløsningen. De beste utbytter oppnås imidlertid ved å tilsette 2,5 g $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ og 2,5 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ pr. g tetracyklin i oppløsningen.

Når salttilsetningen er skjedd økes oppløsningens pH-verdi til 7, hvorved komplekset utfelles og bunnfallet fraskilles, f.eks. ved sentrifugering eller frafiltrering. Bunnfallet oppslemmes i vann, og det surgjøres med svovelsyre til en pH-verdi på 1,2-2,0. Derved spaltes komplekset og tetracyklinet går i oppløsning sammen med manganet i form av manganosulfat, mens bariumsulfat utskilles. For å redusere væskemengden foretas denne oppløsningsprosess hensiktsmessig i to trinn, idet det etter den første oppslemming og surgjøring foretas en frasentrifugering av væsken. Det tilbakeblitte bunnfall oppslemmes på ny i vann, og det surgjøres og sentrifugeres.

Det er hensiktsmessig at det i forbindelse med surgjøringen tilsettes natriumsulfat, idet det har vist seg at det derves fåes et renere tetracyklin og samtidig sikres en mer fullstendig felling av bariumsulfat.

De to væskeporasjoner fra sentrifugeringene forenes nå, og pH-verdien innstilles på det angjeldende tetracyklins isoelektriske punkt, hvorved tetracyklinet utfelles mens mangansulfatet forblir i oppløsning.

En annen metode til utvinning og/eller rensning av tetracyklin er basert på anvendelsen av ionebyttere.

Det har tidligere vært foreslått å foreta en rensning av tetracyklinholdige oppløsninger ved adsorpsjon på svakt eller på sterkt sure ionebyttere, men adsorpsjonen på svakt sure ionebyttere er ikke særlig effektiv og hvis det anvendes en sterkt sur ionebytter er det vanskelig etterpå å frigjøre det adsorberte tetracyklin.

Disse ulemper unngås ved at tetracyklinet adsorberes på en sterkt basisk ionebytter og elueres med sur væske, hvorefter eluatet nøytraliseres og inndampes for gjenutvinning av tetracyklinet.

Denne fremgangsmåte medfører en rekke fordeler, hvorav særlig skal fremheves at en sterkt basisk ionebytter har stor adsorpsjonskapasitet med hensyn til tetracykliner og gir en meget effektiv rensning idet det dels under adsorpsjonen, hvor ionebytteren er positivt ladet, passerer en del positivt ladede ioner uhindret gjennom, dels kan utvaskes, hvorved ytterligere en del uorganiske og organiske forurensninger fjernes. Endelig er det lett å frigjøre det adsorberte tetracyklin fra ionebytteren og gjenvinningen er nesten kvantitativ.

Der finnes i handelen en rekke syntetiske basiske ionebyttere som kan anvendes ved den foreliggende fremgangsmåte. Som eksempel kan nevnes de som forhandles under navnene "Amberlite IRA 400" og "Dowex 1".

Som utgangsmateriale kan anvendes et gjæringssubstrat som er befridd for myceliet av den tetracyklin-produserende mikroorganisme, men de beste resultater fåes ved å gå ut fra mer konsentrerte oppløsninger, f.eks. en ved felling ved det isoelektriske punkt og gjenoppløsning vunnet oppløsning.

Oppløsningen ledes gjennom en ionebyttersøyle bestående av en sterkt basisk ionebytter i hydroksylform, hvorved tetracyklinet adsorberes på ionebytteren. Oppløsningens pH-verdi før gjennomledningen er ikke kritisk da den allikevel heves en del av hydroksylioner fra søylen, således at tetracyklinet fortrinnsvis blir negativt ladet, men den bør dog ikke være vesentlig over 3, da man derved risikerer en utfelling før gjennomledningen.

Etter adsorpsjonen vaskes søylen med vann og derpå eventuelt med alkohol for å fjerne restene av vannet. Alkoholvasken er ikke strengt nødvendig idet den etterfølgende eluering kan foregå med en vandig syre. Utbyttet og rensningen er imidlertid herved mindre enn hvis det vaskes med alkohol, til hvilket det anvendes en med vann blandbar, lavere alkohol, og deretter elueres med en surgjort alkohol, fortrinnsvis metanolisk saltsyre. Ved surgjøringen minskes søylens pH-verdi etterhånden, hvorved tetracyklinet blir overveiende positivt ladet, frastøtes av ionebytteren og oppløses.

For utvinning av tetracyklinet nøytraliseres eluatet.

120068

Dette kan skje på forskjellige måter. For eksempel kan det tilsettes en base, såsom natrium- eller ammoniumhydroksyd, eller det kan behandles med en svakt sur ionebytter i Na^+ -form. Derved dannes imidlertid uorganiske salter og vann, hvilket i regelen er uønsket, da det kan være vanskelig senere å få fraskilt disse forurensninger. Vanninnholdet er især generende, idet det under den senere inndampning av det sure metanoliske eluat damper ren metanol av, således at resten blir stadig mer vannholdig, hvorfor uorganiske forurensninger holdes oppløst i stedet for å felles fraksjonert under inndampningen.

Derfor nøytraliseres det fortrinnsvis ved behandling med en svakt basisk ionebytter. En slik nøytraliserer nemlig uten saltfrigjørelse, og samtidig med at den virker vannsugende - især hvis den på forhånd er skyllet med alkohol - tilbakeholder den en del negative ioner og bevirker derved en ytterligere rensning. Ganske visst tilbakeholdes også en liten mengde tetracyklin, men dette frigjøres under ionebytterens regenerering og tilbakeføres i prosessen.

Ved behandlingen med den svakt basiske ionebytter, f.eks. den under navnet "Amberlite IR 45" forhandlede, heves eluatets pH-verdi til ca. 4. Behandlingen foregår lettest ved at den regenererte og alkoholvaskede ionebytter omrøres i eluatet, inntil nøytralisasjonen har funnet sted, hvorefter ionebytteren frasuges og skylles med litt alkohol. Da både ionebytter og tetracyklin under nøytraliseringen er positivt ladet er tapet av tetracyklin lite.

Den således nøytraliserte oppløsning inndampes nå, hvorved det underveis ytterligere kan skje en utfelling og fjernelse av urenheter, og ved en passende sluttkonsentrasjon på f.eks. 50 mg tetracyklin pr. ml oppløsning utfelles tetracyklinet, enten i form av hydrokloridet ved tilsetning av sterk mineralsyre samt eventuelt et med vann ublandbart oppløsningsmiddel, eller som hydrat under avkjøling. Av moderluten kan det etter fornyet inndampning ytterligere vinnes en del tetracyklin.

Det således vunne tetracyklin kan om nødvendig finrenses ved alminnelig omkrystallisering eller ved kromatografi.

Følgende eksempler tjener til illustrering av fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen.

Eksempel 1.

En frossen kultur av *Streptomyces* MDA 46-6/F 93 opptines hurtig og overføres til en 300 ml Erlenmeyerkolbe som inneholder

120068

40 ml av et podningssubstrat av følgende sammensetning:

Potetstivelse	22 g
Maisstøpevann (tørrstoffmengde)	17 g
Kalsiumkarbonat	3,5 g
Jordnøttolje	2 ml
Vann til et totalvolum på	1 liter

Innen autoklaveringen er pH-verdien innstilt på 6,7.

Kulturen rystes i et rotasjonsrysteapparat (25 mm slag, 250 o/m) ved 28°C i 18-24 timer.

I en podemengde på 10% overføres kulturen deretter til andre Erlenmeyerkolber av samme størrelse, som hver inneholder 40 ml av følgende fermenteringssubstrat:

Potetstivelse	35 g
Maisstøpevann(tørrstoffmengde)	7,5 g
25% ammoniumhydroksyd	6,4 g
65%'s salpetersyre	6,4 g
Vann til et totalvolum på	1 liter

Før autoklavering innstilles substratets pH-verdi på 6,3 med salpetersyre, og det tilsettes 0,23 ml jordnøttolje til hver kolbe.

Etter 60 timers rysting som ovenfor høstes kolbene. Bestemt ved en absorpsjonsmetrisk metode er utbyttet 910 mcg tetra-cyklin og 70 mcg klortetracyklin pr. ml.

Eksempel 2.

En podekultur fremstilles som beskrevet i eksempel 1 og overføres i en podemengde på 2% til to 5 liters glassflasker, som hver inneholder 1 liter av det i eksempel 1 angitte podningssubstrat.

Etter rysting ved 28°C i 30 timer i et rysteapparat (50 mm slag, 150 o/m) overføres innholdet av de to flasker til en 50 liters fermenteringsbeholder, som inneholder 30 liter av det i eksempel 1 angitte fermenteringssubstrat.

Under fermenteringen gjennomblåses det 0,5 liter luft pr. liter substrat pr. minutt, og i de første 18 timer omrøres det med en firebladet omrører, svarende til et energiforbruk på ca. 1,2 watt pr. l, hvorefter omrøringen forsterkes, svarende til et energiforbruk på 1,6-2 watt pr. l. Skumming holdes automatisk i sjakk ved at det forstøves en 7%'s silikonemulsjon inn i beholderen så snart skummet stiger til berøring med en i beholderen anbragt elektrode. Under de første 24 timer av fermenteringen tilsettes ytterligere 2-3 ml jordnøttolje pr. time. Etter 50-56 timers forløp

120068

avhøstes fermenteringssubstratet og det fåes et utbytte pr. ml på 875 mcg tetracyklin, bestemt etter en absorpsjonsmetrisk metode, mens en mikrobiologisk metode viser 1620 mcg.

Eksempel 3.

Dette eksempel illustrerer utvinning av tetracyklinet ved felling med Ba- og Mn-salt.

5 liter av et med en tetracyklin-produserende mikro-organisme forgjæret næringssubstrat innstilles på en pH-verdi på 2,0 med HCl og det sentrifugeres. Til den frasentrifugerte væske, som inneholder 1000 γ tetracyklin pr. ml, settes 12,5 g $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ og 12,5 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Deretter innstilles pH-verdien på 7,0 med 4-n NaOH og det omrøres i 15 minutter. Etter ytterligere henstand i 30 minutter adskilles væske og bunnfall ved sentrifugering. Resttiteren i væsken er 116 γ pr. ml.

Bunnfallet oppslemmes i vann som med H_2SO_4 , innstilles på en pH-verdi på 1,5, og det omrøres i 15 minutter hvorefter det sentrifugeres. Derved vinnes 340 ml væske med en tetracyklintiter på 9430 γ pr. ml. Bunnfallet oppslemmes på ny, omrøres og sentrifugeres hvorved det fåes 122 ml væske med en titer på 932 γ pr. ml.

De to væskeporsjoner forenes og innstilles med NaOH på en pH-verdi på 5,5. Etter 2 timers henstand i kulde sentrifugeres. Resttiteren i væsken er 492 γ pr. ml og det utfelte stoff inneholder etter tørring 285 γ tetracyklin pr. mg.

Eksempel 4.

Dette eksempel illustrerer utvinning av tetracyklin ved adsorpsjon på en sterkt basisk ionebytter.

En sur, vandig oppslemming av et produkt som inneholder ca. 30 vektprosent tetracyklin og er vunnet ved felling ved tetracyklinets isoelektriske punkt sentrifugeres. Væskemengden som vinnes herved utgjør 350 ml og finnes ved spektrofotometrisk analyse å inneholde 6530 γ tetracyklin pr. ml, svarende til en totalmengde på 2285,5 mg tetracyklin.

Etter tilsetning av 350 ml vann sendes oppløsningen gjennom en ionebyttersøyle på 20 ganger 300 mm, som er fremstilt av ca. 100 g "Amberlite IRA 400", som er regenerert til hydroksylform. Gjennomløpshastigheten reguleres til 1 ml pr. minutt, hvorved hele tetracyklilmengden fastholdes på søylen. Det skylles deretter først med 250 ml vann og deretter med 500 ml metanol.

Så elueres søylen med 350 ml saltsur metanol, som er sammensatt i forholdet 5 ml 5-n saltsyre til 95 ml metanol. Eluatet

120068

finnes ved spektrofotometrisk analyse å inneholde 6460 γ tetracyklin pr. ml, svarende til en totalmengde på 2261 mg tetracyklin eller 99% av den opprinnelige mengde.

Det saltsure eluat nøytraliseres nå ved at det tilsettes 28 g "Amberlite IR 45" som på forhånd er vasket med metanol og deretter omrøres i 15 minutter, hvorefter pH-verdien er ca. 3. Så frafiltreres ionebytteren og skylles grundig med metanol, som forenes med filtratet. Oppløsningen som nå inneholder 2150 mg tetracyklin, inndampes til ca. 50 ml, hvorved det utskilles et bunnfall som praktisk talt ikke inneholder tetracyklin. Filtratet opparbeides enten ved ytterligere inndampning, hvorved tetracyklinet utskilles i form av et hydrat, eller ved at dets pH-verdi bringes ned på ca. 1 ved tilsetning av en sterk mineralsyre, hvorved tetracyklinet utskilles i form av hydrokloridet. I begge tilfeller lettes utskillelsen ved tilsetning av et med vann ikke blandbart oppløsningsmiddel, såsom dietyleter.

P a t e n t k r a v .

1. Fremgangsmåte til fremstilling av tetracyklin ad mikrobiologisk vei ved podning og forgjæring av et næringssubstrat med en tetracyklin-produserende stamme av en Streptomyces-art og utvinning av det dannede tetracyklin av det forgjærte substrat, k a r a k t e r i s e r t ved at stammen Streptomyces MDA 46-6/F 93, ATCC 13938, dyrkes under aerobe betingelser på eller i et næringssubstrat med minst det naturlige kloridinnhold, og som inneholder en kilde for assimilerbart kullstoff og nitrogen, samt dessuten vekst-fremmende faktorer, herunder mineralsalter, hvorefter det dannede tetracyklin utvinnes av næringssubstratet.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t ved at tetracyklinet utvinnes av det forgjærte substrat ved felling med et bariumsalt sammen med et mangansalt.

Anførte publikasjoner:

Norsk patent nr. 80.839, 90.077
Annals of the New York Academy of Sciences, bind 60, art.1, p.86-101.
D.J.D. Hockenull: Progress in industrial microbiology Vol. 1, London 1959, p.73-86.