



Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 26.V.1964 (P 104 694)

Pierwszeństwo: 18.VI.1963 Węgry

Opublikowano: 26.IV.1966

Kl. 6 b, 16/03

MKP C 12 d 9/02

UKD



Współtwórcy wynalazku: Gabor Józsa, inż. Lajos Stankovics, Istvan Inczeffi

Właściciel patentu: Chinoin Gyogyszer-és Vegyészeti Termékek Gyára RT, Budapeszt (Węgry)

Sposób otrzymywania fumagiliny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania antybiotyku fumagiliny, który znajduje duże zastosowanie zarówno w medycynie jak i weterynarii.

Dotychczas fumagilinę otrzymywano na drodze fermentacji za pomocą szczepów *Aspergillus fumigatus* H-3 lub *Aspergillus fumigatus* NRRL-2436 (patrz patenty USA 2 652 356 i 2 803 586).

Stwierdzono, że do otrzymywania fumagiliny nadają się niektóre szczepy *Aspergillus fumigatus* var. *helvola* względnie ich mutanty otrzymane metodami sztucznymi i/lub naturalnymi, poddane fermentacji metodą podpowierzchniową w warunkach napowietrzania.

Odmianę pleśni *helvola* gat. *Aspergillus fumigatus* opisano w roku 1938, jak również określono jej właściwości morfologiczne i stwierdzono, że ten typ grzybka wytwarza kwas helwolowy.

Istotą sposobu według wynalazku jest więc stwierdzenie, że pewne szczepy należące do odmiany *helvola* gatunku *Aspergillus fumigatus*, w określonych warunkach mogą wytwarzać nie tylko kwas helwolowy lecz także i fumagilinę.

Szczepy należące do odmiany *helvola* różnią się od innych typów grzybków należących do gatunku *Aspergillus fumigatus* zwłaszcza zaś od szczepów *Aspergillus fumigatus* H-3 i NRRL-2346 zdolnością wytwarzania kwasu helwolowego oraz innymi właściwościami biochemicznymi i morfologicznymi.

2

Stwierdzono ponadto, że niektóre spośród szczepów *Aspergillus fumigatus* var. *helvola* — w przeciwieństwie do opisanych dotychczas szczepów *Aspergillus fumigatus* var. *helvola* — odznaczają się tym, iż obok minimalnych ilości kwasu helwolowego wytwarzają fumagilinę w dużym stężeniu, albo nawet samą tylko fumagilinę. Dzięki temu są one przydatne do wytwarzania fumagiliny na skalę przemysłową. Do tego celu szczególnie odpowiedni okazał się na przykład szczep nr A-33 *Aspergillus fumigatus* var. *helvola* znajdujący się w depozycie Węgierskiego Państwowego Instytutu Higieny pod nr 630.704/23. Szczep ten wyodrębniono z próbki gleby pobranej z zespołu roślinnego należącego do Quarceto-Lithospermetum w górach w przełomie Dunaju na Węgrzech.

Cechy morfologiczne nowego szczepu są następujące.

Kolonია:

barwa grzybni powietrznej: biała-jasna ochra; barwa podłoża: jasno-żółta, jasno-pomarańczowo-brązowa; typu porostu: podobny do zamszu; szybkość rozprzestrzeniania się: średnio umiarkowana; tworzenie zarodników: obfite.

Buława:

kształt: półkulisty, słupkowaty;
długość 50—70 mikronów;
średnica: 30—70 mikronów.

Pęcherzyk (vesiculum):

kształt: butelkowaty

średnica: 9–16 mikronów (kolonia wykazuje również obecność nielicznych szczególnie małych tzw. „wtórnych buław”).

Strzępek końcowy (sterigma):

ugrupowanie: w 1 rzędzie, ściśle, w górnej części pęcherzyka;

długość: 5,7–7,2 mikrona;

szerokość: 2,5–3,2 mikrona.

Zarodnik (conidium):

barwa: bezbarwny, w masie jasno-żółto-brunatnawy;

kształt: okrągły, jajowaty;

średnica: 2,5–3,3 (3,7) mikrona.

Nitka zarodnikująca:

długość: 150–400 mikronów;

średnica: 3,5–7,2 mikrona, zwiększa się ku górze;

barwa: bezbarwna;

powierzchnia ścianki: gładka, nieco falista.

Natomiast znane szczepy *Aspergillus fumigatus* charakteryzują się poniższymi cechami morfologicznymi.

	<i>Aspergillus fumigatus</i> NRRL 2436	<i>Aspergillus fumigatus</i> H-3
Kolonie:		
barwa grzybni powietrznej:	biała do ciemno-zielonej	biała do ciemno-szarej
barwa podłoża:	cielista do kremowo-żółtego	jasno-cytrynowo-żółta
typ porostu:	podobny do zam-szu	kłaczkowaty
szybkość rozprzestrzeniania się:	umiarkowana	rozprzestrzenia się
tworzenie zarodników	obfite	umiarkowane
Buławy:		
kształt:	zwarty, słupkowy	zwarty, słupkowy
długość:	70–95 mikronów	75–125 mikronów
średnica:	30–40 mikronów	35–60 mikronów
Pęcherzyki:		
kształt:	butelkowaty, w górnej połowie pełny	butelkowaty, w górnej połowie pełny
średnica:	12–20 mikronów	14–20 mikronów
Strzępki końcowe:		
ugrupowanie:	w 1 rzędzie, równoległe do osi nitki, skupione	w 1 rzędzie, równoległe do osi nitki, skupione
długość:	5–7,5 mikrona	4,5–7,5 mikrona
średnica:	1,5–2,5 mikrona	1,5–2,5 mikrona
Zarodniki:		
barwa:	zielona	zielona
kształt:	kulisty, chropowaty	kulisty, chropowaty
średnica:	2,5–3,0 mikronów	2,5–3,5 mikronów
Nitki zarodnikujące:		
długość:	70–650 mikronów	35–400 mikronów
średnica:	2,5–5,5 mikrona	2,5–7,0 mikronów
barwa:	zielona	zielona
powierzchnia ścianki:	gładka	gładka

Hodowlę nowego szczepu A-33 *Aspergillus fumigatus* var. *helvola* wytwarzającego fumagilinę prowadzi się na pożywce zawierającej azot, węgiel oraz sole nieorganiczne w temperaturze 26–28°C i przy wartości pH środowiska 4–7. W sposobie według wynalazku należy dobrać taką pożywkę, aby nie uległa ona zbyt wczesnemu zalkalizowaniu, gdyż spowodowałoby to zahamowanie biosyntezy fumagiliny. Stwierdzono, że wymienionym warunkom odpowiada taka pożywka, w której stosunek węgla do azotu wynosi 20–60:1. Jako organiczne źródła azotu można stosować mąkę sojową, wyciąg namokowy kukurydzy, mączkę z orzechów laskowych itd. Korzystnie jest, gdy stosuje się wyciąg namokowy kukurydzy o zawartości 50% substancji stałej, w ilości 2–10% wagowo w stosunku do pożywki.

Stwierdzono ponadto, że w przeciwieństwie do danych w literaturze dla znanych dotychczas szczepów, cukry złożone nie są odpowiednie w hodowli szczepów *Aspergillus fumigatus* *helvola* wytwarzających fumagilinę. Jako węglowodany najodpowiedniejsze są cukry proste względnie dwucukry. Na przykład z bardzo dobrym rezultatem można stosować sacharozę, jak też glukozę, przy czym — w przeciwieństwie do znanych dotychczas sposobów (na przykład patent USA 2803 586) — wielokrotne uzupełnianie pożywki glukozą nie jest konieczne. Jako źródło cukru można także stosować na przykład melasę.

Do pożywki hodowlanej wprowadza się również sole nieorganiczne zawierające azot jak: azotan sodowy, potasowy, amonowy, nieorganiczne sole fosforanowe, na przykład: fosforan jednopotasowy, fosforan dwusodowy, fosforan jednoamoniowy itd. oraz inne sole nieorganiczne, na przykład chlorek potasowy, siarczan magnezowy itd. Te ostatnie sole stosuje się w ilości po 0,05–0,1% wagowo w przeliczeniu na całkowitą objętość pożywki.

Korzystnie jest prowadzić fermentację w obecności pierwiastków śladowych na przykład żelaza. Stwierdzono, że w tym charakterze z dobrym rezultatem można stosować cynk albo bor w ilości 0,001–0,01% wagowo na objętość pożywki. Zastosowanie tych pierwiastków w tym celu dotychczas nie było znane.

U opisanych w literaturze szczepów *Aspergillus fumigatus* wydajność fumagiliny wynosi 100–400 γ/ml, podczas gdy szczepy *Aspergillus fumigatus* var. *helvola* stosowane w sposobie według wynalazku zwiększają tę wydajność do 800–1000 γ/ml.

Sposobem według wynalazku otrzymuje się fumagilinę na drodze fermentacji w obecności szczepu *Aspergillus fumigatus* var. *helvola* albo jego mutantów, najkorzystniej w obecności szczepu *Aspergillus fumigatus* var. *helvola* A-33, metodą podpowierzchniową w warunkach napowietrzania, w temperaturze najkorzystniej 26–28°C i przy pH pożywki najkorzystniej 4–7.

W procesie biosyntezy, sposobem według wynalazku szczepionkę zarodnikową sporządza się na pożywce Czapek-Doxa, przy czym inkubacja trwa 7–10 dni w temperaturze 28°C, po czym

zawieszoną zarodników na przykład szczepu *Aspergillus fumigatus* var. *helvola* A-33 przenosi się na pożywkę posiewową stosując na przykład 10 ml zawiesziny zarodników na 100 ml pożywki posiewowej, przy czym pożywka ta zawiera wymienione uprzednio źródła azotu, węgla oraz śladowe ilości soli żelaza i cynku i/lub boru.

Kulturę posiewową hoduje się na trzęsawce w temperaturze najkorzystniejszej 26–28°C przez okres 20–48 godzin, przy ciągłym mieszaniu (około 350–450 obr/min) i napowietrzaniu, po czym w znany sposób zaszczepia się nią właściwą pożywkę produkcyjną, zawierającą wymienione wyżej źródła azotu i węgla oraz pierwiastki śladowe. Szczepionkę posiewową stosuje się w ilości około 10–20% objętościowo w stosunku do pożywki produkcyjnej. Fermentację prowadzi się przy ciągłym mieszaniu, najkorzystniejszej 350–450 obr/min i napowietrzaniu, przy czym stosunek objętości powietrza doprowadzanego na minutę do objętości brzezki fermentacyjnej wynosi około 1:1. Proces biosyntezy w temperaturze 26–28°C trwa około 144–168 godzin. Zawartość fumagiliny w brzezce pofermentacyjnej wynosi 400–1000 γ na 1 ml.

Następnie pH brzezki nastawia się za pomocą NaOH lub NaHCO₃ na wartość około 9, wskutek czego fumagilina zawarta w grzybni zostaje z niej wymyta i przechodzi całkowicie do roztworu, po czym grzybnię odsącza się.

Produkt końcowy można wyodrębnić z brzezki fermentacyjnej różnymi metodami, na przykład przez tworzenie soli z zasadami organicznymi lub nieorganicznymi. Można również stosować metody ekstrakcyjne i/lub adsorpcyjne. Również po wyodrębnieniu można fumagilinę przeprowadzać w sól. Dobre wyniki daje wytrącanie produktu wodorotlenkiem sodowym przy pH = 9,0. Dalsze szczegóły sposobu według wynalazku zawierają poniższe przykłady.

Wytwarzający fumagilinę szczep *Aspergillus fumigatus* var. *helvola* można z bardzo dobrym rezultatem przechowywać na pożywce Czapek-Doxa (przechowywany w temperaturze +4°C w ciągu roku nie traci aktywności). Szczep ten poddany liofilizacji zachowuje swoją zdolność produkcyjną przez lata. Po dodaniu 5–7% gliceryny, zamrożeniu do temperatury –25––35°C i przechowywaniu w temperaturze –10°C, można z hodowli wstrząsanej otrzymać dobre szczepionki, które z kolei można z powodzeniem stosować nawet po upływie wielu miesięcy. Dla dużej hodowli zarodnikowej bardzo odpowiednia jest również ogólnie znana pożywka ze słodu.

Przykład I. Pożywkę Czapek Doxa zaszczepia się zawieszoną zarodników szczepu *Aspergillus fumigatus* var. *helvola* A-33. Po 7–10 dniach inkubacji w temperaturze 28°C warstwę zarodników splukuje się wyjałowioną wodą destylowaną z dodatkiem 1% tweenu 80, po czym można użyć je jako szczepionkę. Tak zwana pożywka posiewowa, którą stosuje się w porcjach po 100 ml w kolbach Erlemayera o pojemności 500 ml, posiada następujący skład:

3% sacharozy,
1% wyciągu namokowego kukurydzy,

0,1% fosforanu jednopotasowego,
0,05% chlorku potasowego,
0,05% MgSO₄·7H₂O,
0,001% FeSO₄·7H₂O,

pH = 6,5 (przed wyjałowieniem),

Pożywkę posiewową zaszczepia się 10 ml szczepionki, po czym kulturę wytrząsa w ekscentrycznej trzęsawce stołowej o 250–350 obr/min, przez 20–48 godzin w temperaturze 28°C. Tak otrzymaną czynną kulturę grzybni zaszczepia się na pożywkę fermentacyjnej w kolbie Erlemayera o pojemności 500 ml. Skład tej pożywki jest następujący:

7% sacharozy,
1% wyciągu namokowego kukurydzy,
0,2% fosforanu jednopotasowego,
0,1% azotanu amonowego,
0,05% chlorku potasowego,
0,05% MgSO₄·7H₂O,
0,05% FeSO₄·7H₂O,
pH = 6,5 (przed wyjałowieniem).

Optymalna ilość szczepionki wynosi 10–20%. Wytrząsanie w trzęsawce stołowej kontynuuje się przez 144–168 godzin.

Zawartość fumagiliny oznaczona spektrofotometrycznie w zakresie UV wynosi 400–500 γ /ml.

Przykład II. 6 litrów pożywki posiewowej przygotowanej w sposób jak w przykładzie I zaszczepia się otrzymaną w wyżej opisanym sposób zawieszoną zarodników *Aspergillus fumigatus* var. *helvola* A-33 lub jego czynną kulturą grzybnioową, po czym inkubuje się w temperaturze 28°C przez 24–28 godzin przy ciągłym mieszaniu i przewietrzaniu (stosunek objętości powietrza na minutę do objętości brzezki wynosi 1:1). Przeciwnienieniu stosuje się środki ogólnie używane w tym celu w przemyśle fermentacyjnym (na przykład olej słonecznikowy, palmowy, oleje silikonowe lub 1%-owy alkoholowy roztwór okta-dekanolu). 6 litrów pożywki fermentacyjnej o składzie jak w przykładzie I zaszczepia się 600–1000 ml w ten sposób otrzymanej kultury. Skład pożywki jest taki sam jak wyżej, jedynie zawartość cukru obniża się do 4%.

Fermentację prowadzi się przy ciągłym mieszaniu (350–450 obr/min) i przewietrzaniu (stosunek objętości doprowadzanego powietrza na minutę do objętości brzezki wynosi 1:1) w ciągu 144–168 godzin. W tych warunkach otrzymuje się 500–600 γ fumagiliny na 1 ml. Następnie pH brzezki nastawia się na wartość = 9,0, wskutek czego substancja czynna przechodzi całkowicie do roztworu, zaś grzybnię odsącza się.

Wartość pH przesączu nastawia się przy pomocy 0,1%-owego kwasu fosforowego do wartości = 6,5, po czym dodaje się 2,2% chlorku barowego i 1,6% krzemionki. Wytrącony osad fosforanu barowego, który porywa ze sobą z przesączu nierozpuszczalne zanieczyszczenia, odsącza się, przy czym filtrację ułatwia ziemia okrzemkowa.

Z kolei pH klarownego przesączu nastawia się przy pomocy 0,2%-owego kwasu fosforowego do wartości 3,0, po czym fumagilinę ekstrahuje się octanem butylu i buforowym roztworem boranu. pH połączonych wyciągów nastawia się 3%-owym

kwasem fosforowym do wartości = 3,0 i ponownie ekstrahuje fumagilinę octanem butylu.

Połączone wyciągi w octanie butylu odwadnia się siarczanem sodowym w ilości 3% objętościowych, po czym siarczan sodowy odsąca się, a przesącz zagęszcza pod próżnią 0,1 mm Hg — 1/20 początkowej objętości.

Pozostałość rozpuszcza się w trzydziestokrotnej objętości wrzącego metanolu i następnie roztwór ten zadaje dwukrotną objętością wody destylowanej.

pH roztworu wodnometanolowego nastawia się kwasem fosforowym na 2,5. Wytrącony rozdrobniony (koloidalny) osad fumagiliny adsorbuje się na ziemi okrzemkowej i następnie odsąca.

Zaadsorbowaną fumagilinę miesza się w ciągu 30 minut z trzydziestokrotną objętością gorącego metanolu, wskutek czego następuje jej wymycie. Wrzący roztwór fumagiliny w metanolu odbarwia się węglem zwierzęcym (w ilości 2% objętościowych), po czym sączy przez płytę filtracyjną Seitza K₅.

Przesącz zagęszcza się pod próżnią (1 minutę) w atmosferze azotu do 1/20 początkowej objętości i następnie poddaje krystalizacji w temperaturze —10°C w ciągu 8—10 godzin, kryształy odsąca się na filtrze G-4 i suszy w temperaturze 40°C bez dostępu światła. W razie potrzeby fumagilinę przekrystalizowuje się z dwudziestokrotnej objętości metanolu zawierającego 50% wody.

Następnie kryształy suszy się, przesiewa i przechowuje w 100 gramowych ampulkach w stanie sproszkowanym w temperaturze 0°C, w atmosferze azotu i bez dostępu światła.

Otrzymuje się 0,8 g fumagiliny, która zawiera 80—85% substancji czynnej. Temperatura topnienia 190—194°C; (λ)_D²⁰ = —26° (C = 0,25 w metanolu); skład % 0 = 24—26, % C = 56—58.

Przykład III. 6 litrów pożywki posiewowej opisanej w przykładzie I zaszczenia się opisaną w przykładzie I szczepionką zarodnikową *Aspergillus fumigatus* var. *helvola* A-33. Po rozwinięciu się hodowli pobiera się z niej 10—20% i przenosi na pożywkę o następującym składzie:

- 6% sacharozy,
- 2% wyciągu namokowego kukurydzy, (w przeliczeniu na substancję stałą),
- 0,3% fosforanu jednopotasowego,
- 0,2% azotanu sodowego,
- 0,1% chlorku potasowego,
- 0,05% MgSO₄·7H₂O,
- 0,001% FeSO₄·7H₂O.

Fermentację prowadzi się w temperaturze 28°C, w ciągu 144—168 godzin, przy ciągłym mieszaniu (350—450 obr/min) i przewietrzaniu, po czym otrzymuje się 800—900 g fumagiliny w 1 ml.

pH brzcзки fermentacyjnej nastawia się 0,3%-ami wagowo wodorotlenku sodowego (w postaci 20%-owego roztworu do wartości = 9 i następnie odsąca grzybną. Przesącz przy jednoczesnym mieszaniu, zakwasza się 0,3% kwasem fosforowym do pH = 3, po czym wytrąconą koloidalnie fumagilinę adsorbuje się na ziemi okrzemkowej (Hilfo-Celite) użytej w ilości 0,5% objętościowo w stosunku do objętości roztworu. Osad odsąca

się, a przesącz zadaje dziesięciokrotną objętością octanu butylu. Mieszaninę tę ogrzewa się do 40—45°C, intensywnie mieszając, przy czym fumagilina przechodzi do octanu butylu. Roztwór w octanie butylu sączy się i osusza siarczanem sodowym. Po zagęszczeniu pod próżnią (0,1 mm Hg) w temperaturze 40°C do 1/5 objętości początkowej, pozostałość rozpuszcza się w dwudziestokrotnej objętości wrzącego metanolu. Następnie po dodaniu dwukrotnej objętości wody destylowanej, mieszaninę zakwasza się kwasem fosforowym do pH = 2,5, wskutek czego wytrąca się fumagilina w postaci rozdrobnionego osadu.

Przez dodanie ziemi okrzemkowej w ilości około pięciokrotnej w stosunku do spodziewanej ilości fumagiliny, antybiotyk zostaje na niej zaadsorbowany, po czym ziemię okrzemkową odsąca się.

Następnie fumagilinę wymywa się z ziemi okrzemkowej trzydziestokrotną objętością gorącego acetonu. Roztwór acetonowy odbarwia się na gorąco za pomocą 2% węgla zwierzęcego i sączy przez płytę filtracyjną Seitza.

Przesącz zagęszcza się w atmosferze azotu, przy ciśnieniu 1 mm Hg, do 1/30 początkowej objętości i prowadzi krystalizację w temperaturze —10°C, w ciągu 8—10 godzin. Wydzielone kryształy odsąca się i suszy w temperaturze 40°C w ciemności. Krystaliczny produkt można przekrystalizować z dwudziestokrotnej objętości metanolu zawierającego 50% wody. Otrzymane kryształy przechowuje się w ampulkach, w atmosferze azotu, w temperaturze 0°C i bez dostępu światła.

Otrzymuje się 2,9 g fumagiliny o zawartości 92—95% substancji czynnej. Temperatura topnienia = 191—194°C; (λ)_D²⁰ = —24,2° (C = 5% w chloroformie); skład: % 0 = 24—26, % C = 56—58.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania fumagiliny na drodze fermentacji, **znamienny tym**, że proces biosyntezy prowadzi się w obecności szczepu *Aspergillus fumigatus* var. *helvola* A-33, albo jego mutantów metodą podpowierzchniową w warunkach napowietrzania, po czym antybiotyk wyodrębnia się z brzcзки pofermentacyjnej w znany sposób na drodze ekstrakcji i ewentualnie przeprowadza w sól z zasadą organiczną lub nieorganiczną.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że fermentację prowadzi się w temperaturze 26—28°C.
3. Sposób według zastrz. 1 i 2, **znamienny tym**, że fermentację prowadzi się przy wartości pH środowiska 4—7.
4. Sposób według zastrz. 1—3, **znamienny tym**, że fermentację prowadzi się na pożywce, w której stosunek węgla do azotu wynosi 20 : 1—60 : 1.
5. Sposób według zastrz. 1 i 4, **znamienny tym**, że fermentację prowadzi się na pożywce, w której jako źródło azotu stosuje się wyciąg namokowy kukurydzy w ilości 2—10% objętościowo w stosunku do objętości brzcзки (przy 50-procentowej zawartości substancji stałych).

6. Sposób według zastrz. 1—5, **znamienny tym**, że fermentację prowadzi się w obecności dwucukrów, zwłaszcza w obecności sacharozy.
7. Sposób według zastrz. 1—6, **znamienny tym**, że fermentację prowadzi się w obecności pierwiastków śladowych, najkorzystniej w obecności cynku i/lub boru.

8. Sposób według zastrz. 1—7, **znamienny tym**, że po zakończeniu biosyntezy wartość pH brzeczki doprowadza się do około 9 za pomocą NaOH lub NaHCO_3 w celu przeprowadzenia fumagiliny zaadsorbowanej w grzybni do roztworu.