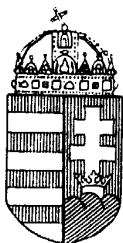


(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

201 807 B

(22) Bejelentés napja: 1988.08.12.

(21) 4334/88

(33) US

(32) 1987.08.13.

(31) 07/084.761

(51) Int Cl⁵

C 12 P 21/04

B 01 D 15/00

(41) (42) Közzététel napja: 1989.05.29.

(45) Megadás meghírdetésének dátuma

a Szabadalmi Közlönyben: 1990.12.28. SZKV 90/12.

(72) Feltaláló:

Waite, Jack Peter, Fareham, Hampshire (GB)

(73) Szabadalmaz:

American Cyanamid Co. Stamford, Connecticut (US)

(54) ELJÁRÁS BIOMASSZAMENTES AVOPARCIN ANTIBIOTIKUM ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás nagy hatóanyagtartalmú, biomasszamentes avoparcin antibiotikum előállítására. A találmányszerint úgy járunk el, hogy az antibiotikumot vizes közegből, savas körülmények

között motmorillonit-agyagon adszorbeálják, majd az antibiotikumban dús anyagot vizes bázissal kezelve jutnak az avoparcinhoz.

A leírás terjedelme: 8 oldal, 1 ábra

HU 201 807 B

A találmány tárgya új eljárás biomasszától mentes avoparcin antibiotikum előállítására.

A találmány szerinti eljárást úgy végezzük, hogy az antibiotikumot vizes közegből, savas körülmények között montmorillonit-agyagon adszorbeáljuk, majd az antibiotikumban dús anyagot vizes bázissal kezelve kapjuk az antibiotikumot.

Az avoparcin kereskedelmi forgalomban levő, fontos antibiotikum, amelyet hústermelő állatok táplálékában alkalmaznak növekedésük meggyorsítása céljából. Ezt az antibiotikumot általában fermentációs eljárással állítják elő; maga az antibiotikum lényegében két, vízben oldható glikopeptidből áll, amelyeket az alábbiakban az avoparcin alfa- és béta-komponensének nevezünk. Ezeket a komponenseket a következő közlemények ismertetik: W.J. McGraham és társai „Az avoparcin komponenseinek szerkezete”, *J. Am. Chem. Soc.* 102, 1671 (1980); valamint J. Am. Chem. Soc. 101, 2337 (1979).

Állatok takarmányadalékként alkalmazva az avoparcint általában az állatok takarmányába vagy azzal együtt adagolták alkil-szulfát-komplexének alakjában az előállítása során kapott száraz anyagokkal – azaz a biomasszával – együttesen. A gyakorlatban ezt a terméket a következő lépésekből álló eljárással állították elő: (1) az antibiotikumot tartalmazó, fermentációs folyamatból eredő biomasszát megsavanyították; (2) a megsavanyított keveréket szűrősegédanyaggal és alkáli-fém-alkil-szulfáttal kezelték; (3) az így kezelt, savanyított keveréket szűrték; és (4) az így kapott szilárd anyagot megszáritották. A szilárd anyag az avoparcin alkil-szulfát-komplexét, a szűrősegédanyagot és a biomasszát tartalmazta. Jóllehet az így előállított terméket jó hatásfokkal alkalmazták állatok növekedési sebességének a meggyorsítására, és közel egy évtizeden át semmiféle, nem kívánatos mellékhatásról vagy toxicitási problémákról nem számoltak be, a terméket tartalmazó biomassza viszonylag alacsony koncentrációja a piacképességet (értékesítési lehetőségeit), valamint adagolási formáinak lehetőségeit bizonyos mértékig korlátozták.

Bár a technika jelenlegi állása szerint az avoparcin-alkil-szulfát-komplexek finomított formában, micélliummentesen is előállíthatók, a jelenleg ismert eljárások nem kielégítőek az olyan nagyméretű (térfogatok) szempontjából, amelyek a hústermelő ipar által igényelt avoparcin-alkil-szulfát-komplex mennyiségnek megfelelnek. E méreteket ugyanis korlátozza a szűrés időtartamának meghosszabbodása, valamint a jelentős mennyiségű energia és/vagy üzemanyagfogyasztás, amelyet a száraz, stabilis termék előállításához szükséges szárítás igényel. Ezenkívül a léptéknövelés során kapott avoparcin-alkil-szulfát-komplex fizikai tulajdonságai és külseje is némi kívánnivalót hagy maga után.

A technika jelenlegi állása szerint ismert, ipari jelentőségű eljárások annyiban korlátozottak, hogy a termékben a hatóanyag koncentrációját egyrészt az előállítási folyamat jellege, másrészt a fermentációs eljárások jelenlegi helyzete korlátozza. A jelenleg ismert eljárásokkal folyamatosan legfeljebb 17–18% maximális hozamot érnek el. A termékben levő hatóanyag koncentrációja teljes mértékben függ a fermentációba vitt törzstől, és sarzsról sarzsra elke-

rülhetetlenül, jelentősen változik. Minőségi és mennyiségi szempontból nehéz pontosan meghatározni a fermentáció számos komponensét, valamint a kapott termékek valamennyi komponensét, amelyek a hatóanyagon kívül jelen vannak. Továbbá, a kapott komponensek jellege és viszonylagos koncentrációja sarzsról sarzsra változik. Ezenfelül a jelenleg ismert eljárásokkal gyártott termékek fizikai és kémiai tulajdonságai korlátozzák a kiszerelt formák (készítmények) típusait is. A 4 485 102 számú egyesült államokbeli szabadalmi leírás tökéletesített eljárást ír le megnövelt hatású avoparcin-alkil-szulfát-komplex elkülönítésére olyan módon, hogy a terméket adszorbeálják, és egyes szennyezéseket olyan szorpciós közegben távolítanak el, amely az antibiotikumot nem tartja magában.

A találmány tárgya mindezek alapján eljárás nagy hatóanyagtartalmú, biomasszamentes avoparcin előállítására.

A találmány szerint lényegében úgy járunk el, hogy az avoparcint savas körülmények között, vizes közegből montmorillonit-agyagon adszorbeáljuk, majd az így kapott, avoparcinban dús agyagot vizes bázissal kezelve jutunk az avoparcinhoz.

Azt találtuk, hogy nagy hatóanyagtartalmú, biomasszától mentes avoparcin kapható olyan módon, hogy az antibiotikumot vizes közegből, savas körülmények között adszorbeáljuk, így az antibiotikumot a fermentációs biomasszából eltávolítjuk, s így számos problémát elkerülhetünk, amelyek a technika jelenlegi állása szerint ismert eljárásokban felmerülnek, mivel ezek az eljárások a szennyezéseket távolítják el az antibiotikumból.

A találmány szerinti eljáráshoz olyan adszorbensnek kell rendelkezésre állnia, amely egyrészt megfelelően nagy kapacitással rendelkezik az avoparcin adszorbeálására vizes oldatból, az avoparcin stabilitásával összeegyeztethető körülmények között; másrészt lehetővé teszi az avoparcin kinyerését az adszorbensről vizes eluálással olyan körülmények között, amelyek az avoparcin lebomlását nem idézik elő; az adszorbensnek olcsónak, és – előnyösen – az előállítási eljárásba visszavihetőnek (reciklizálhatónak) kell lennie; továbbá az adszorbens sűrűségének legalább 2-nek (tömeg/térfogat g/m) kell lennie, hogy az adszorbens elkülönítése az „üres” fermentálóból és a szilárd micélliumtól differenciális centrifugálás útján lehetővé váljék.

Meglepő módon azt találtuk, hogy olyan, természetben előforduló és kémiaiilag módosított agyagok, amelyek a montmorillonit sejtes szerkezetével rendelkeznek – s amelyeket közös néven montmorillonitoknak nevezünk – a fenti követelményeknek eleget tesznek. Mind a természetes, mind a kémiaiilag módosított montmorillonit-agyagok vizes oldatból, savas körülmények között 8–12 tömeg% avoparcint adszorbeálnak. Ezekről az adszorbensokról az avoparcin vizes-alkális eluálással, előnyösen 10,5–10,9 pH-érték mellett könnyen kinyerhető. Azt találtuk továbbá, hogy a montmorillonitok adszorpciós képessége az ismételt felhasználás során nem romlik. Ezek az agyagok hidratált nátrium- és/vagy kalcium-magnézium-alumínium-szilikátok, amelyek a montmorillonit sejtszerű szerkezetével rendelkeznek. E szerkezetet az jellemzi, hogy két

szilícium-dioxid-réteg „szendvics”-szerűen fog közre egy alumínium-hidroxid-réteget. A montmorillonit szerkezete tehát egyszerű formában az Si-Al-Si jelöléssel fejezhető ki. A találmány szerinti eljárásban alkalmazható montmorillonit-agyagok a kereskedelmi forgalomból különböző formákban szerezhetők be: ezek a kalcium-forma, nátriumforma, valamint olyan kalciumforma, amelyet különböző mértékben savas kezeléssel aktiválnak. Ezeknek az agyagoknak az átlagos összetétele tömegszázalékban kifejezve általában: körülbelül 50–65% SiO₂, 10–20% Al₂O₃, 2–4% MgO, 3–4% CaO és 0,2–4% Na₂O. Ezek az értékhátárok természetesen átlagértékek, amelyek természetes jellegüktől, feldolgozásuktól és előkezelésüktől függően változnak. A találmányszerinti eljárásban előnyösen alkalmazható montmorillonit-adszorbensek felülete általában 70–240 m²/g, és 2%-os vizes szuszpenziójuk pH-értéke körülbelül 3–11. Ezek a montmorillonit-agyagok általában „bentonit” vagy „fullerföld” néven ismertek, és nagy mennyiségben is könnyen hozzáférhetők. Kereskedelmi forgalomban kapható montmorillonit-agyagok például a Wolclay[®] Wyoming bentonitok, a Veegum[®], Panther Creek[®], Brebent, Surrey Powder és a Fulmont, amelyek többsége különböző minőségekben kapható.

A gyakorlatban a találmány szerint úgy járhatunk el, hogy az avoparcint tartalmazó fermentációs masszát ásványi savval – előnyösen kénsavval – megsavanyítjuk. Azt találtuk, hogy az avoparcint tartalmazó fermentáléban a montmorillonitos adszorpció optimális pH-értéke 1,9–2,0. E pH-tartományban az avoparcin 93–95%-a a vizes fázisban oldva van, a maradékot a szilárd micélium tartalmazza. Az így kapott, savanyított fermentálét a továbbiakban előnyösen az alábbi két út egyikén hadva dolgozzuk fel:

1. A savanyított keveréket bármilyen alkalmas módon – például forgó vákuumszűrővel (forgódobos vákuumszűrőn) – szűrhetjük, s így olyan, savas szűrletet kapunk, amely fermentációs biomaszától (azaz a szilárd micéliumtól és a szilárd tápanyagmaradékoktól) mentes.

E szűrletet a továbbiakban az adszorbenssel kezeljük elegendő időn át ahhoz, hogy az adszorpció optimális legyen; ehhez általában fél órától egy óráig terjedő idő szükséges. Szükség esetén az adszorbensnek a szűrletben képezett szuszpenzióját kénsav alkalmazásával 1,9–2,3-ra ismételtelen beállítjuk. Az avoparcint tartalmazó adszorbent szűrővel különíthetjük el.

2. Még előnyösebb módon úgy is eljárhatunk, hogy az avoparcint közvetlenül a vizes, savanyított, teljes fermentáléból adszorbeáljuk. Ebben az eljárásban az adszorbent a keverékhez adjuk, majd a pH-értékét 1,9–2,3-ra állítjuk, és az így kapott elegyet elegendő időn át keverjük, hogy az adszorpció optimális legyen: ehhez általában fél órától egy óráig terjedő idő szükséges. Az avoparcinban dús adszorbent az „üres” fermentálétól – amely a biomaszát magában foglalja – differenciális centrifugálással különítjük el, s ehhez osztatlan forgórészes, megfelelően tervezett centrifugát alkalmazunk. A gyakorlatban ez az elkülönítés azért lehetséges, mert az adszorbens sűrűsége viszonylag magas (2,5 g/ml) a fer-

mentlében jelenlevő, szilárd micélium sűrűségével (megközelítőleg 1 g/ml) összehasonlítva.

A teljes fermentáléból történő adszorpciónak két jelentős előnye van:

a. Szükségtelemmé válik a fermentlé szűrése, és az ezzel kapcsolatos költségek; és

b. a kiinduló keverékben levő avoparcinnak 5–7%-a, amely az „üres” elkülönített keverékben van jelen, szintén kinyerhető úgy, hogy porlasztó szárítást alkalmazunk, ami a teljes eljárás hatékonyságát növeli.

Meghatároztuk, hogy a találmány szerinti eljárásban adszorbensként alkalmazott montmorillonit optimális mennyisége 1 g avoparcinra vonatkoztatva 8–15 g adszorbens. Az adszorbens alkalmazott mennyisége az adszorpciós kapacitásától, a részecskeméretétől, valamint az adott eljárásváltozattól függ. Az 1. eljárás esetében (amikor az adszorpciót a savas keverékszűrletében végezzük), optimálisan 8–10 g adszorbent alkalmazunk 1 g avoparcinra számítva az adszorbens természetétől függően. A 2. eljárásban (amikor az adszorpciót a teljes fermentáléban végezzük) legelőnyösebben 1 g avoparcinra számítva 13–15 g adszorbent használunk.

Nyilvánvaló, hogy nagyobb mennyiségű adszorbens alkalmazása is hatékony lehet, és az adszorbensnek fentebb megadott előnyös mennyiségei a minimális mennyiségeket jelentik arra a célra, hogy az eljárások termelékenységet a legmagasabbá, és az antibiotikum kinyerését maximálissá tegyék a költségek, hulladéktermékek és kezelendő anyagok lehetséges csökkentése mellett.

A fenti két eljárás bármelyikével kapott, avoparcinban dús adszorbensről az avoparcin könnyen kinyerhető bázisos körülmények között végzett eluálással. Az eluálás szempontjából a pH optimális értéke 10,5–10,8; a gyakorlatban az eluátumban az avoparcin körülbelül 25–30 g/liter maximális koncentrációban van jelen.

Az avoparcinban dús adszorbent vízben szuszpendáljuk, és a szuszpenzió pH-értékét alkáli-, például nátronlúgoldat, nátrium-karbonát oldat, vagy előnyösen ammóniaoldat hozzáadásával 10,5–10,8-ra állítjuk. Ezután a szuszpenziót bármilyen megfelelő módszerrel – például centrifugálással vagy szűrőpréssel – szűrjük, és így kapjuk az elsődleges eluátumot. A tejes kinyerése céljából a szűrőkalácsot (centrifugakalácsot) megfelelő térfogatú alkálikus vízzel, előnyösen híg vizes ammóniaoldattal mossuk. Az így kapott másodlagos eluátumot az elsődleges eluátummal egyesíthetjük a további feldolgozás céljából.

Ha az így kapott eluátumot közvetlenül porlasztószárításnak vetjük alá, akkor a kapott termék általában körülbelül 50–55% avoparcint tartalmaz, mivel a montmorillonit a fermentációs keverékből az avoparcinon kívül más anyagokat is adszorbeál, s ezek az anyagok az avoparcinnal együtt jutnak az eluátumba.

Abból a célból, hogy a porlasztó szárítás előtt az eluátumot tisztítsuk, és így a termékhatánytartalmát növeljük, az eluátumot membránszűrőnek (ultraszűrőnek) vethetjük alá, mivel az eluátumban levő „szennyezések” túlnyomórésze kisebb molekula-tömegű, mint az avoparcin. Ezek a szennyezések

olyan membrán alkalmazásával távolíthatók el, amelyek molekulatömeg elválasztási határa 1500–2000 tartományban van. Ez lehetővé teszi a jelentős mértékű tisztítást. Ezzel az eljárással a porlasztó szárítás után 90%-os terméket kaphatunk.

Jóllehet számos technika eljárás alkalmazható a termék eluátumból való elkülönítésére akár közvetlenül, akár membránszűrési tisztítás után, előnyös a porlasztó szárítás (porlasztva szárítás) alkalmazása. Megfelelően nagy térfogati sűrűségű por előállítása céljából célszerű az eluátum betöményítése. Azt találtuk, hogy vékonyfilmbepárlás útján az eluátumban az avoparcin koncentrációja 150 g/liter fölé növelhető.

A találmány szerinti eljárással előállított termék színe a krémszíntől a halvány-őzbarnáig terjed, és vízben könnyen oldható; az oldat pH-értéke 6,3–6,5. A találmány szerinti 1. és 2. eljárást az I. folyamatábrán szkematikusan mutatjuk be.

A találmány szerinti eljárást az alábbi, nem korlátozó jellegű kiviteli példákban részletesen ismer-

5

10

15

20

tetjük.

1. példa

Különböző ásványi adszorbensek avoparcint adszorbeáló képessége avoparcin-szulfátot tartalmazó vizes oldatból

11 g avoparcin-szulfátot ("ahogyan kapjuk") 500 ml desztillált vízben oldunk. A meghatározás szerint (túlnyomásokos folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel) az így kapott oldat 18,2 g/liter avoparcint tartalmaz, pH-értéke 3,9.

Ebből az oldatból 25 ml térfogatú alikvot részeket egyenként 2,5 g kereskedelmi forgalomból beszerezhető adszorbesekkel kezelünk. A szuszpenziókat környezeti hőmérsékleten 30 percig rázva egyen-súlyba hozzuk, majd szűrjük, és a szűrlet avoparcin-tartalmát HPLC módszerrel meghatározzuk. Ered-ményeink, amelyeket az I. táblázatban összegezhe-tünk, mutatják, hogy az avoparcinnak oldatból való adszorpciójára a montmorillonit-agyagok a legalkalmasabbak.

I. táblázat

Adszorbens	Az oldatból adszorbeált avoparcin %	Avoparcin-koncentráció az adszorbensen %
Montmorillonit-nátrium (Brebent, Laporte Earths)	98,5	17,9
Montmorillonit-kalcium, savval aktivált (Fulmont AA, Laporte)	84,7	15,4
Attapulgit (Attasorb LVM, Lawrence Chemicals)	51,0	9,3
Szintetikus anyag (Clekate T-21, Johns-Manville)	41,1	7,5
Kaolin (English China Clays)	20,8	3,8
Titán-dioxid, anatász- (Tiona WDB, Laporte)	12,4	2,25
Cellulózpor (Cla-o-cel, CECA)	10,7	1,95
Kovaföld (G-típus, Merck)	5,5	1,0
Hidroxil-apatit (BDH)	4,9	0,9

2. példa

Avoparcin adszorpciója fermentléből montmorillonit-nátriummal (a fermentálást a 3 338 786 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás szerint végeztük)

4. liter avoparcin fermentléhez 80 g Dicalite 478 szűrési segédanyagot teszünk, majd keverés közben lassú ütemben addig adunk hozzá 98%-os kénsavat, amíg a pH értéke 1,9–2,1-re be nem áll. A savanyított keveréket előre bevont vákuumszűrőn szűrjük, s így – a HPLC mérés szerint – 18,9 g/liter koncentrációjú savas szűrletet kapunk. E szűrletből 500 ml térfogatú alikvot részeket Fulbent 570 (Laporte Earths, Ltd.) típusú montmorillonit-nátrium adszorbennsel kezelünk, és a pH-értéket kénsav hozzáadásával a megfelelő értékre ismételtelen beállítjuk.

18 °C-on történő 30 perces keverés után a szuszpenziókat szűrjük, és a szűrletek avoparcintartalmát HPLC módszerrel meghatározzuk.

Eredményeinket a II. táblázatban összegezzük.

II. táblázat

pH értéke a kezelés során	Adszorbeált avoparcin %-ban				
	11	12	13	14	Átlag
2,2	89,8	–	94,6	–	92,2
2,1	–	91,7	–	95,4	93,55
2,0	91,4	–	94,7	–	93,05
1,9	–	92,6	–	95,4	94,0
Átlag	90,6	92,15	94,65	95,4	–

3. példa

A pH befolyása az avoparcinnak fermentlé szűrletéből montmorillonit-nátriumon végbemenő adszorpciójára

(A fermentálást a 2. példában megadott irodalom szerint végeztük)

Az avoparcingyártási fermentlé egy részletét 2 tömeg/térf.% Dicalite 478 szűrési segédanyaggal kezeljük, és a pH értékét 98%-os kénsav lassú hozzáadásával 2,1-re állítjuk. A savanyított keveréket előbevonatos vákuumszűrőn szűrjük, s így – a HPLC mérés szerint – 21,1 g/liter avoparcint tartalmazó savas szűrletet kapunk.

Ezt a szűrletet 250 ml térfogatú alikvot részekben egyenként 20 g montmorillonit-nátrium adszorbenssel (Fulbent 570, Laporte Earths Ltd.) kezeljük. A szuszpenzió pH-értékét keverés közben 98%-os kénsav vagy szilárd nátrium-hidrogén-karbonát hozzáadásával állítjuk be. Az elegyet 30 percig környezeti hőmérsékleten keverjük, majd a szuszpenziókat szűrjük, és avoparcintartalmukat a szűrletben HPLC-méréssel meghatározzuk. E kísérleteink eredményeit a III. táblázatban összegezzük.

III. táblázat

pH értéke a kezelés során	A fermentlé szűrletéből adszorbeált avoparcin %
1,9	69,1
2,8	67,7
3,8	64,4
4,9	64,8
5,8	60,4
6,9	38,8
7,6	10,8

4. példa

Biomasszamentes avoparcin közbenső termék előállítására fermentlé szűrletében végzett adszorpcióval

(A fermentálást a 2. példánál megadottak szerint végeztük)

Avoparcingyártásból származó fermentlé egy részletét 2 tömeg/térf.% Dicalite 478 szűrési segédanyaggal kezeljük, és a pH értékét 98%-os kénsavval 2,1-re állítjuk. A savanyított fermentlevet előbevonatos vákuumszűrőn szűrjük, s így savas fermentlé-szűrletet kapunk. A HPLC mérés szerint a szűrlet 17,48 g/liter avoparcint tartalmaz.

A szűrletből 5 litert 2,0 pH-értéken 150 g Celkate-T-21-vel kezelünk, a szuszpenziót szűrjük, és a szűrőkalácsot 450 ml vízzel 2,0 pH érték mellett mossuk. Az 5,3 liter térfogatú szűrlet avoparcintartalma a HPLC mérés szerint 16,36 g/liter.

5,25 liter szűrlethez 650 g természetes eredetű montmorillonit-kalciumot (Surrey powder, Laporte Earths Ltd.) adunk. Ekkor a szuszpenzió pH értéke 3,3, ezt 98%-os kénsav hozzáadásával 2,0-ra csökkentjük. A szuszpenziót 15 percig keverjük, majd a hatóanyagot tartalmazó adszorbent vákuumszűrővel elkülönítjük. Az „üres” szűrletet a HPLC-mé-

rés szerint 1,32 g/liter avoparcint tartalmaz.

A nedves adszorbens szűrőkalácsot 2 liter vízben szuszpendáljuk, és a pH értékét 36%-os vizes ammóniaoldathozzáadásával 10,8-ra állítjuk. A szuszpenziót szűrjük, s így 2,155 liter elsődleges eluátumot kapunk, amelynek avoparcintartalma 27,24 g/liter.

A szűrőkalácsot 1 liter vízben reszuszpendáljuk, és a pH értékét a fentiek szerint 10,8-ra állítjuk. Szűrés után 1,160 liter másodlagos eluátumot kapunk, amelynek avoparcintartalma 10,53 g/liter.

Végül a szűrőkalácsot 0,5 liter vízben reszuszpendáljuk, és a pH értékét 10,8-ra állítjuk. Szűrés után 0,55 liter harmadlagos eluátumot kapunk, amelynek avoparcintartalma 5,42 g/liter.

A három eluátumfrakciót egyesítjük, s így olyan oldatot kapunk, amelynek avoparcintartalma 19,31 g/liter, és összes szilárdanyagtartalma 45,55 g/liter. Ennek az eluátumnak egy részletét porlasztva szárítjuk, ehhez egy mini-porlasztószárítót alkalmazunk, amelynek bevezetési levegőhőmérséklete 200 °C, kivezetési levegőhőmérséklete 98 °C. Az így kapott termék avoparcintartalma a HPLC mérés szerint 40,4%. (Avoparcin jellemzői: $[\alpha]_D^{25} = -95^\circ 280 \text{ m}\mu$ ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 48,5$ semleges oldatban).

A fenti eredmények alapján az eljárás egyes lépéseinek hatásfoka (hatékonysága) számítással a következő:

	%
Fermentlé-szűrlet/Celkate-val kezelt szűrlet	99,2
Celkate-val kezelt szűrlet/avoparcinban dús adszorbens	92,0
Avoparcinban dús adszorbens/eluátum	93,5
Eluátum/porlasztva szárított termék	95,3
Teljes fermentlé savas szűrlet/száraz termék	81,3

5. példa

Biomasszamentes avoparcin közbenső termék előállítására fermentlé szűrletében végzett adszorpcióval

(A fermentálást a 2. példában megadott irodalom szerint végeztük)

A fermentlé egy részletéből savas szűrletet állítunk elő a 4. példában leírtak szerint. A szűrlet a HPLC mérés szerint 17,47 g/liter avoparcint tartalmaz.

A szűrletet 2,0 pH-értéken (kénsav hozzáadása után) 25 g/liter Celkate-T-21-vel kezeljük és derítjük. Az így kezelt szűrlet 16,31 g/liter avoparcint tartalmaz.

Ezután párhuzamosan háromféle módon dolgozunk, három különböző montmorillonit alkalmazásával, ezek:

- montmorillonit-nátrium (Brebent);
 - természetes eredetű montmorillonit-kalcium (Surrey powder);
 - savval aktivált montmorillonit-kalcium (Flumont 300C).
- A fenti montmorillonitokat a Laporte Earths Ltd. cég szállította.

Valamennyi adszorbensből 216 g-ot – azaz 12 tömeg/térf.%-ot – adunk minden egyes 1800 ml térfogatú fermentlé-szűrlethez, és a szuszpenzió pH-értékét 98%-os kénsavval 2,0-re állítjuk. 15 perc keverés

után a szuszpenziót vákuumszűrőn megsűrjük, és HPLC mérésel meghatározzuk az „üres” szűrlet avoparcintartalmát.

Ezután minden egyes, avoparcinban dús adszorbens szűrőkalácsot kétszer reszuszpendálva 10,5 pH-értéken eluálunk, miközben a pH-értékét 36%-os vizes ammóniaoldat hozzáadásával állítjuk be. Így

5

900 ml elsődleges és 400 ml másodlagos eluátumot kapunk. Az elsődleges eluátum egy részletét miniporlasztószárítóban szárítjuk 200 °C bevezetési és 95 °C kivezetési levegőhőmérséklettel.

A fentiekben említett három előállítási változat eredményeit a IV. táblázatban foglaltuk össze.

IV. táblázat

Az adszorbens típusa	A	B	C
HPLC mérés szerint g/liter avoparcin			
Az „üres” fermentléiszűrletben	0,84	1,15	1,26
Elsődleges eluátumban	22,2	23,4	24,7
Másodlagos eluátumban	9,3	9,8	8,6
Kinyert avoparcin%			
Savanyított fermentlé szűrlete/adszorbens	94,9	92,9	92,3
Adszorbens/eluátum	92,2	96,5	98,2
A teljes fermentlé szűrlete/száraz termék	87,5	89,6	90,5

Az avoparcin kinyerése a porlasztószárítás során minden esetben lényegében kvantitatív. Az elsődleges eluátumból kinyert száraz termékek hatóanyag-tartalma az alábbi:

Avoparcin „d.b.”% 60,5 67,6 66,6

Avoparcin forgatóképessége: $[\alpha]^{25}_D = -95^\circ (\pm 3,8^\circ)$ (c=0,780 vízben)

6. példa

Avoparcin adszorpciója közvetlenül a fermentléből montmorillonit-kalcium alkalmazásával (A fermentálást a 2. példában megadottak szerint végeztük)

Avoparcin fermentációs gyártásából származó 500 g fermentlét 250 g vízzel hígítunk, és 100 g montmorillonit-kalcium adszorbent (Surrey powder, Laporte Earths) adunk hozzá, majd a pH-értékét 98%-os kénsav hozzáadásával 2,2-re állítjuk.

Az avoparcinban dús adszorbent az „üres” fermentléből csőcentrifugában különítjük el. A centrifugálást 2 percig percnkénti 1000 fordulatszámmal végezzük. A felülúszót dekantáljuk, avoparcintartalmát megmérjük, és a szuszpendált szilárd anyag avoparcintartalmát meghatározzuk.

7. példa

Centrifugális dekantáló alkalmazása montmorillonit adszorbensnek a fermentlétől való elkülönítésére

Elkülönítési kísérletet végeztünk a P600 Super-D-canter berendezés (gyártója a Pennwalt Ltd. cég) alkalmazásával.

115 kg, avoparcin fermentációs gyártásából származó fermentlét, amely 19,7 g/kg hatóanyagot tartalmaz, 25 kg savval aktivált montmorillonit-kalcium-

25

mal (Fumont 300 C, Laporte Earths Ltd.) kezelünk. Ezután a pH-értékét 98%-os kénsavval 2,2-re állítjuk.

Az így kapott keveréket a dekantáló berendezésbe visszük különböző betáplálási sebességgel, és kivált mintákban megvizsgáljuk az avoparcintartalmát és a szuszpendált szilárdanyag-tartalmát.

Az optimális betáplálási sebesség mellett, ami körülbelül 8 liter/perc, a dekantálóberendezésből kiürített adszorbens iszap 49% szilárd anyagot tartalmaz.

E kísérlet eredményei megerősítik annak a lehetőségét, hogy az „üres” fermentlé ipari méretben ki-elégítően elkülöníthető a hatóanyagban dús adszorbentől.

30

35

40

45

50

55

8. példa

Avoparcin eluálása montmorillonit-kalciumról 750 g differenciális centrifugálási kísérletből kapott iszapot (lásd a 7. példát, amely 49% szilárd anyagot tartalmaz, és avoparcintartalma 42 g/kg, 300 g vízben reszuszpendálunk, a szuszpenzióhoz 100 g 36%-os vizes ammóniaoldatot adunk, majd 15 percig keverjük. Ezután vákuumszűrővel kapjuk az elsődleges eluátumot. A szűrőkalácsot 300 ml híg vizes ammóniaoldattal (36%-os vizes ammóniaoldat 50:1 arányban hígítva) mossuk, és így kapjuk a másodlagos eluátumot.

A szűrőkalács mosását 300 ml híg vizes ammóniával megismételjük, és így jutunk a harmadlagos eluátumhoz, amelyet a következő eluálás során az első mosáshoz használunk.

Ezt az eljárást 5 kísérletben ismételtük. Eredményeinket a V. táblázatban összegeztük.

V. táblázat

A kísérlet sorszáma	Az elsődleges eluátum pH-ja	Eluátum frakció	Kapott g	Az eluátum eluátum g/kg	Az eluátum hatóanyagtartalma g
1.	10,3	1.	452,7	43,69	19,78
		2.	332,0	36,81	12,22
		3.	314,1	-	-
2.	10,8	1.	499,2	41,41	20,67
		2.	341,5	26,50	9,05
		3.	315,5	-	-
3.	10,6	1.	495,2	42,08	20,84
		2.	334,8	29,64	9,92
		3.	310,6	-	-
4.	10,5	1.	469,4	43,02	20,19
		2.	330,1	36,40	12,02
		3.	306,2	-	-
5.	10,6	1.	488,3	41,93	20,47
		2.	334,5	32,26	10,79
		3.	304,3	6,97	2,12

Összes kinyert avoparcin g-ban

158,07

Összes bevétel az adszorbens iszapban g-ban:

157,5

Az eluátumfrakciókat egyesítjük, és a terméket 2 méter átmérőjű kísérleti berendezésben, fúvóka alkalmazásával porlasztva szárítjuk. A levegő bevezetési hőmérséklete 250 °C, kivezetési hőmérséklete 100 °C. A termék hatóanyagtartalma 52%. Az avoparcin kinyerése a szárítási lépésben lényegében kvantitatív. Optikai forgatóképesség: $[\alpha]_D^{25} = -95^\circ (\pm 3,8^\circ)$ (c = 0,780, vízben).

9. példa

Avoparcin közvetlen adszorpciója fermentléből savval aktivált montmorillonit-kalcium alkalmazásával: az „üres” adszorbens reciklizálásának a befolyása

(A fermentálást a 2. példában megadottak szerint végeztük)

Kísérletsorozatot végeztünk az eljárás hatékonyságának a vizsgálatára reciklizált, „üres” adszorbens alkalmazásával.

A kísérletsorozat első kísérletében a következőképpen járunk el:

500 g, avoparcin fermentációs gyártásából származó fermentlevet 100 g vízzel hígítunk, és pH-értékét 98%-os kénsav hozzáadásával 1,9–2,1-re állítjuk. Ezután 150 g montmorillonit-kalcium adszorbent (Fulmont 300 C, Laporte Earths Ltd.) adunk hozzá, és a szuszpenziót 15 percig keverjük. Az avoparcinban dús adszorbent az „üres” fermentlétől csőcentrifugában elkülönítjük, az oldatlan részt vízben reszuszpendáljuk, s az így kapott 800 g szuszpenziót második centrifugálásnak vetjük alá, hogy a micélium szilárd anyagait az adszorbentől teljesen elkülönítsük.

A centrifugamaradékot 500 g vízben reszuszpendáljuk, és a pH-értékét 36%-os vizes ammóniaoldattal 10,6-ra állítjuk. Hozzáadunk 5 ml 0,1 tömeg/térf.%-os A150 flokkuláns poliakrilamid-oldatot a szűrés elősegítésére, majd vákuumszűréssel kapjuk az elsődleges eluátumot. A szűrőkalácsot kétszer mossuk egyenként 150 ml híg vizes ammó-

niaoldattal, így másodlagos és harmadlagos eluátumfrakciót kapunk. A harmadlagos eluátumot reciklizáljuk, és a következő előállítás során az első mosáshoz használjuk.

30 Az így kapott „üres” adszorbent megtartjuk, és reciklizáljuk a kísérletsorozat következő kísérletébe.

A következő kísérleteket a fentiekben leírt eljárással végezzük a következő kivétellel:

35 a. az előző kísérletből származó üres adszorbent alkalmazunk, azonban 15 g friss montmorillonit-kalciumot (Fulmont 300 C) adunk hozzá;

b. az adszorbens hozzáadása után a pH-értékét 98%-os kénsavval 2,3-ra visszaállítjuk;

40 c. az eluáló lépésben első mosófolyadékként az előbbi kísérletből reciklizált, harmadlagos eluátumot használjuk.

E kísérletsorozatunk 12 kísérletből állt, és ezeknek összesített eredményei az alábbiak:

45		Avoparcin g
	Összes fermentlé-bevétel	135,1
	A vizes fázisban összesen jelen van	128,8
50	Veszteség az 1. „üres” fermentlében	11,1
	Veszteség a 2. „üres” fermentlében	2,4
	Összes veszteség	13,5
	Összesen kinyert hatóanyag az eluátumban	116,0
55	Hatásfok (kinyerés) fermentlé/eluátum%	85,9

60 A sorozatban az adszorpciók képesség nem romlik, valamint az eluálás során a szuszpenzió szűrhetősége sem változik.

A visszanyert adszorbens végső száraz tömege 174,5 g.

65 A kinyert avoparcin jellemzői: $[\alpha]_D^{25} = -95^\circ (\pm 3,8^\circ)$ (c = 0,780, vízben).

SZABADALMIIGÉNYPONTOK

1. Eljárás biomasszamentes avoparcin antibiotikum előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az antibiotikumot vizes közegből, savas körülmények között montmorillonit-agyagon adszorbeáljuk, majd az antibiotikumban dús agyagot vizes bázissal kezelve kapjuk az antibiotikumot.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy montmorillonit-agyagként természetes eredetű vagy kémiaiilag módosított montmorillonit-nátriumot, montmorillonit-kalciumot vagy azok keverékét alkalmazzuk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy olyan montmorillonit-agyagot alkalmazunk, amelynek felülete 70–240 m²/g, és 2 tömeg%-os vizes szuszpenziójának pH-értéke 3-tól 11-ig terjed.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a montmorillonit-agyagot az avoparcint tartalmazó szűrt, savanyított fermentléhez vagy a teljes vizes savanyított fermentléhez adjuk, és közben a pH értékét 1,9 és 2,3 között tartjuk.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemez-*

ve, hogy 1 g avoparcin kinyerésére 15 g montmorillonit-anyagot alkalmazunk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy

5 a teljes avoparcin-fermentlevet ásványi savval 1,9–2,3 pH-értékre savanyítjuk;

a savanyított teljes fermentléhez, vagy a teljes fermentlé szűrésével kapott fermentlé-szűrlethez montmorillonit-agyagot adunk;

10 a keveréket fél órától egy óráig terjedő időn át keverjük, és közben a pH értékét 1,9 és 2,3 között tartjuk;

az avoparcinban dús adszorbenst szűréssel vagy differenciális centrifugálással elkülönítjük;

15 az avoparcinban dús adszorbenst vizes bázissal kezelve 10,5–10,8 pH-jú szuszpenziót állítunk elő;

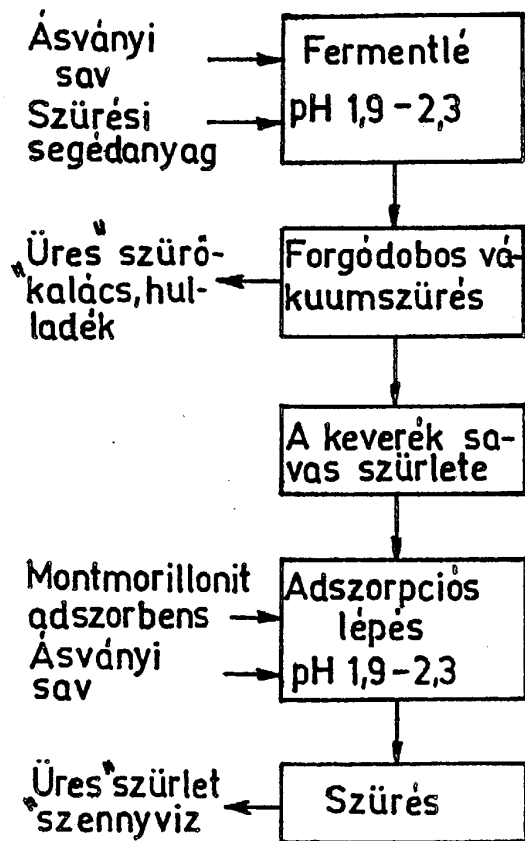
az adszorbenst szűréssel elkülönítjük; majd elválasztjuk a biomasszamentes avoparcint, az avoparcint tartalmazó bázisos szűrletet közvetlenül porlasztva szárítjuk.

20

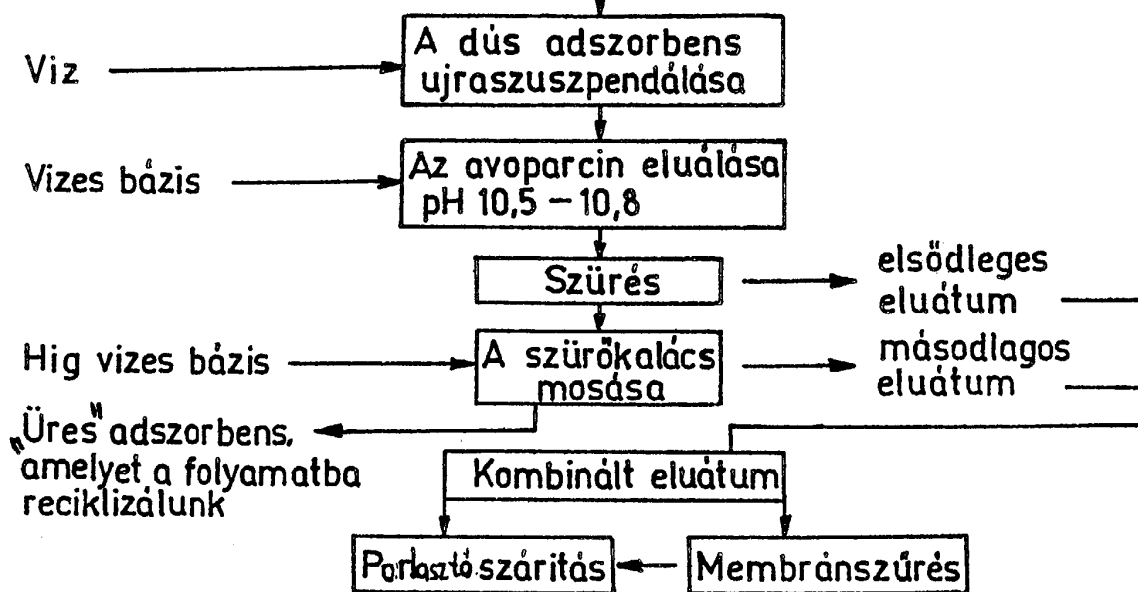
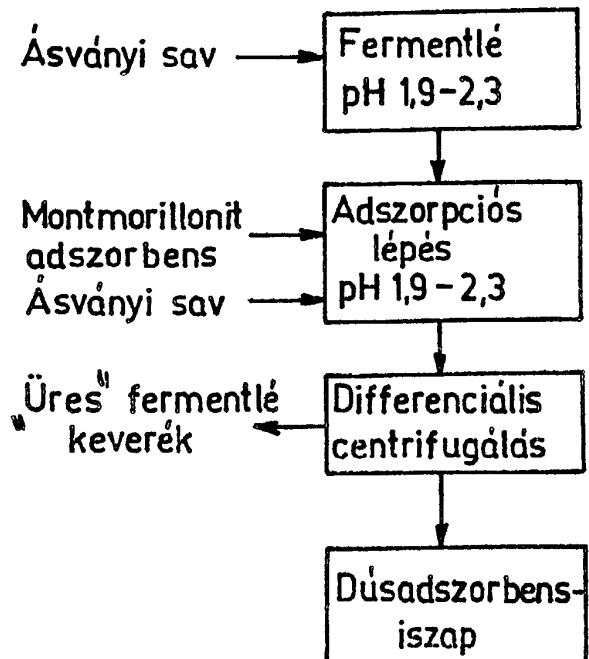
7. A 6. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy ásványi savként kénsavat, és bázisként vizes ammóniaoldatot alkalmazunk.

I. folyamatábra

1. ELJÁRÁS



2. ELJÁRÁS



A termék hatóanyagtartalma: 50 – 90 %