

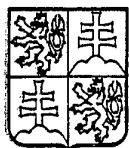
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

277 617

ČESKÁ
A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA

(19)



FEDERÁLNÍ
ÚŘAD PRO
VYNÁLEZY

(21) Číslo přihlášky: **802-90**

(22) Přihlášeno: 19. 02. 90

(40) Zveřejněno: 15. 09. 91

(47) Uděleno: 31. 12. 92

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 03. 93

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁵:

C 12 P 1/06

C 12 P 13/08

// **A 61 K 31/71, A 23 K 1/17**

(73) Majitel patentu:

VÚ pro biofaktory a veterinární léčiva, Jílové
u Prahy, CS;

(72) Původce vynálezu:

Malaník Viktor RNDr. CSc., Kouřim, CS;
Křišťan Vladimír ing., Kouřim, CS;
Starý Petr ing., Mníšek pod Brdy, CS;
Kutal Tomáš ing. CSc., Praha, CS;
Ševčík Bohumil prof. MVDr. DrSc., Jílové u
Prahy, CS;
Mazán Štefan RNDr., Banská Bystrica, CS;

(54) Název vynálezu:

**Způsob izolace různých aplikačních
forem tylozinu**

(57) Anotace:

Způsob získávání různých forem antibiotika tylozinu z fermentačních procesů při výrobě ve větších objemech, kdy se před další separací antibiotika tylozinu zařadí mikrofiltrace nebo ultrafiltrace či případně i diafiltrace nativní nebo upravené fermentační pudy. Získaný filtrát obsahující tylozin je posléze zahuštěn a případně i částečně odsolen na membráně nepropouštějící izolované antibiotikum. Získaný koncentrát zbavený nežádoucích příměsí se použije přímo pro přípravu konečného produktu pro použití v živočišné výrobě.

CS 277 617 B6

Vynález se týká způsobu izolace různých aplikačních forem antibiotika tylozinu připravovaného biotechnologickým fermentačním postupem.

Tylozin je 16tičlenné makrolidové antibiotikum často používané ve veterinární praxi. Vyrábí se submerzní kultivací mikrobiálního kmene *Streptomyces fradiae*. V praxi jsou používány různé aplikační formy tohoto antibiotika, počínaje technickými a konče čistými formami.

Izolační postupy umožňující získat požadované formy lze rozdělit zhruba do tří kategorií. V případě výroby technického tylozinu je izolační postup založen na sušení fermentační pudy obsahující tylozin na rozprašovací sušárně (čs. AO 270 801). Výhodou této bezodpadové technologie je jednoduchost, nevýhodou je omezená použitelnost získaného preparátu a vzhledem k přítomným balastním látkám i možnost ztrát antibiotické aktivity během dalšího skladování.

Modifikací tohoto postupu lze dosáhnout přípravy vodorozpustného technického tylozinu. Vhodným způsobem upravená fermentační puda obsahující antibiotikum tylozin je zfiltrována nebo zcentrifugována a čirý roztok je usušen na rozprašovací sušárně. Výsledný produkt se oproti technické formě vyznačuje vyšším obsahem tylozinu a někdy i výrazně lepší stabilitou antibiotické aktivity. Částečná nevýhoda tohoto postupu spočívá v tom, že při filtraci nebo odstředění fermentační pudy se odseparují pouze nerozpustné látky, zatímco makromolekulární látky typu bílkovin a podobně přecházejí do roztoku. Při sušení na rozprašovací sušárně jsou některé látky hlavně bílkovinného charakteru tepelně denaturovány, což má za následek, že výsledný produkt při aplikaci, kdy je rozpouštěn ve vodě, poskytuje zakalené roztoky. Další nevýhodou tohoto postupu je omezená možnost způsobu aplikace vodorozpustné technické formy.

Třetí způsob izolace tylozinu je založen na klasických postupech chemického a farmaceutického průmyslu a bývá používán pro získání jeho čistých forem. Izolační postup bývá většinou realizován podle následujícího schématu: filtrace nebo odstředění fermentační pudy, extrakce filtrátu do organické fáze, reextrakce do vodné fáze při pH 4,5 - 6,5 a zpracování extraktu na požadovanou čistou formu tj. bázi nebo příslušnou sůl (Hamill R.L. a spol. Antibiotic Chemotherapy 11, (5) 328 - 334 (1961), Čs. AO 197600).

Hlavní nevýhodou při realizaci výroby čistých forem tylozinu je práce s velkým objemem organického extrakčního rozpouštědla vyplývající z dodržení nutného poměru vodné a organické fáze 5 : 1. Používání velkého množství organického extrakčního činidla vyžaduje jak zavedení jeho regenerace, tak i odstranění jeho zbytků z vyextrahované vodné fáze, a to s ohledem na další likvidaci odpadních vod. Tyto operace prováděné s relativně velkými objemy jsou při dodržování všech hygienických a ekologických hledisek ekonomicky a technologicky velmi náročné.

Jednou z možností, jak některé uvedené nedostatky objevující se při izolaci vodorozpustného technického tylozinu a čistých

forem tylozinu odstranit, je zařazení membránových separačních procesů do jednotlivých izolačních postupů. V současné době jsou mikrofiltrace, ultrafiltrace a reverzní osmóza běžnými separačními postupy používanými v mnoha oborech, zejména ve spojení se separací látek ionogenní a neionogenní povahy jako jsou koloidy, polymery, makromolekuly a rozpustné nízkomolekulární látky nacházející se převážně ve vodném prostředí (Souviva Jan S.: Reverse Osmosis, Logos, London 1971; Belford G.: Synthetic Membrane Processes, Academic Press Inc. 1984). Jsou použitelné jak v kontinuálním, tak i diskontinuálním uspořádání. Účinnost separace je závislá na typu použitých separačních membrán, jejich dělicích hranicích, hydrodynamických poměrech v separačním zařízení a na použitém tlaku a teplotě. Aplikací těchto technik je dosahováno buď zvýšení koncentrace žádaných látek anebo naopak získávání upravených vodných roztoků bez přítomnosti nežádoucích příměsí (Delyannis A., Delyannis E.-E.: Seawater and Desalting, Vol. 1., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1980).

Některé nedostatky spojené s izolací vodorozpustného technického tylozinu anebo čistých forem tylozinu odstraňuje způsob podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že fermentovaná půda nativní nebo modifikovaná, její filtrát či supernatant s obsahem sušiny od 0,15 do 15 % hmot. a obsahem tylozinu od 0,05 do 30 % hmot. v sušině se případně mikrofiltrují nebo ultrafiltrují, a i případně diafiltrují. Výběr vhodné porozity a typu mikrofiltračních a ultrafiltračních membrán umožňuje zajistit, aby tylozin se nacházel převážně v permeátu, oddělen od většiny doprovázejících balastních makromolekulárních látek. Zařazením diafiltračního kroku s 0,1 až 10 násobným množstvím diafiltrační vody vzhledem k původnímu objemu zpracovávané fermentační pudy lze zajistit až 98 % výtěžnost celého procesu. Permeát obsahující antibiotikum tylozin je pak dále zpracováván buď koncentrací na reverzně-osmotických membránách zajišťujících odstranění části rozpouštědla a případně i rozpuštěných nízkomolekulárních látek, nebo jinými vhodnými izolačními postupy.

Způsobem podle vynálezu dochází k podstatné ekonomizaci výroby různých forem tylozinu, neboť se pracuje s menšími objemy roztoků a organických rozpouštědel, zlepšují se hygienické a ekologické poměry při výrobě a uspořádají se různé formy energie. Zároveň zařazením metod membránové separace do izolačních postupů se zvyšuje výtěžek izolovaného tylozinu a snižuje možnost jeho případné inaktivace. Způsobem podle vynálezu se dále umožní získat stabilní vodorozpustný technický tylozin, což současné metody přípravy zatím neumožňují.

V dalším je vynález blíže objasněn v příkladech provedení, aniž by se jimi omezoval.

Příklad 1

Fermentační půda obsahující antibiotikum tylozin o aktivitě 7 650 m.j./ml byla upravena formalínem tak, aby jeho výsledná koncentrace v půdě byla 0,5 % objemových a byla zahřáta po dobu 3 minut při teplotě 70 °C. Po ochlazení a koagulaci byla suspenze zfiltrována přes křemelinový filtr a 20 litrů čirého filtrátu

o pH - 6,8 bylo podrobena ultrafiltraci na ultrafiltračních membránách (např. FS61PP) zadržujících vysokomolekulární látky o molekulové hmotnosti větší než 20 000. Permeát byl podroben reverzní osmóze na membránách (např. HC-50) zadržujících látky o relativní molekulové hmotnosti větší než 300. Koncentrát o objemu 3,5 l obsahující antibiotikum tylozin o koncentraci 41 000 m.j./ml byl pak dále zpracován extrakcí do 1,5 l organického rozpouštědla a dalšími izolačními postupy na čistou formu tylozinu base. Ztráty antibiotické aktivity při membránových separačních procesech nepřesáhly hodnotu 6,2 % a dosažení koncentrační faktor byl 5,7.

Příklad 2

Fermentační půda o aktivitě 6 200 m.j./ml byla zfiltrována podle bodu 1 a čirý filtrát o objemu 15 l byl koncentrován a částečně odsolen filtrací přes reverzně-osmotické membrány zadržující molekuly o relativní molekulové hmotnosti větší než 300. Koncentrát o objemu 1,7 l a aktivitě 53 000 m.j./ml byl zasušen na rozprašovací sušárně za vzniku technického vodorozpustného tylozinu. Ztráty antibiotické aktivity během reverzní osmózy dosáhly 3,1 % a dosažený koncentrační faktor byl 8,8.

Příklad 3

Tylozinová fermentační půda o aktivitě 6 500 m.j./ml byla zahřata po dobu 3 minut na 70 °C. Po ochlazení na teplotu 20 °C bylo 15 l fermentační půdy ultrafiltrováno přes ultrafiltrační membrány, které zadržovaly částice a molekuly o větší relativní molekulové hmotnosti než 50 000. Po získání 5 l ultrafiltrátu a současném poklesu rychlosti průtoku permeátu přes ultrafiltrační membránu pod hodnotu 25 l.hod.⁻¹.m⁻² byla k fermentační půdě přidávána diafiltrační voda rychlostí odpovídající rychlosti ultrafiltrace. Diafiltrace byla ukončena po přidání 17 l diafiltrační vody a bylo získáno 23 l permeátu obsahujícího tylozin o koncentraci 3 850 m.j./ml. Permeát byl poté zakoncentrován a částečně odsolen reverzní osmózou jako v příkladu 1 na konečný objem 4,1 l. Koncentrace antibiotika v koncentrátu byla 20 500 m.j./ml. Koncentrát byl dále zpracován extrakcí do 1,8 l organického rozpouštědla a dalšími izolačními postupy na čistou formu tylozinu tartarátu. Ztráty antibiotické aktivity během membránových separací dosáhly 14 % a dosažený koncentrační faktor byl 3,7.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Způsob izolace různých aplikačních forem antibiotika tylozinu připraveného biotechnologickým fermentačním postupem před jeho další separací například do organického rozpouštědla nebo zpracováním na technickou vodorozpustnou formu vyznačující se tím, že fermentovaná půda nativní nebo modifikovaná, její filtrát nebo supernatant s obsahem sušiny od 0,25 do 15 % hmot. a s obsahem tylozinu od 0,05 do 30 % hmot. v sušině se mikrofiltruje, nebo ultrafiltruje, případně i diafiltruje, přičemž podíl prošlý mikrofiltračními nebo ultrafiltračními membránami nebo původní filtrát či supernatant je zakoncentrován a částečně i odsolen na membráně nepropouštějící antibiotikum tylozin.

Konec dokumentu
