

Opublikowano dnia 3 kwietnia 1963 r.

C12d 9/06



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 46586

Kl. 30 h, 6

Kl. internat. C 12 d

VEB Arzneimittelwerk Dresden *)

Radebeul, Niemiecka Republika Demokratyczna

Sposób wytwarzania antybiotyku zawierającego 1,4-dwu-(p-hydroksyfenylo)- -2,3-dwu-izonitrylobutadien-(1,3)

Patent trwa od dnia 2 kwietnia 1960 r.

Pierwszeństwo: 27 stycznia 1960 r. (Niemiecka Republika Demokratyczna).

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania antybiotyku zawierającego 1,4-dwu-(p-hydroksyfenylo)-2,3-dwu-izonitrylobutadien-(1,3). Antybiotyk ten składa się ze składowych X, Y, Z, przy czym X stanowi główną część zawartą w mieszaninie w ilości 50—70%. Ta główna część X pod względem chemicznym jest zdefiniowana jako 1,4-dwu-(p-hydroksyfenylo)-2,3-dwu-izonitrylobutadien-(1,3). Wiadomo, że antybiotyk ten odznacza się termostabilnością i działaniem wielowartościowym.

Do wytwarzania tego antybiotyku znany jest sposób, według którego hoduje się kultury pleśni sposobem powierzchniowym na podłożu Czapek-Doxa z dodatkiem 0,5% autolizatu drożdżowego, aż do zestarczenia się micelli, po czym roztwór hodowli odrzuca się a wysuszoną masę micelli stosuje do otrzymania antybiotyku. Micellę tę ekstrahuje się organicznymi rozpuszczalnikami, zwińszcza eterem, acetonem, alkoholem, octanem etylu i innymi i przez oddestylowanie otrzymuje się zanieczyszczony jeszcze antybiotyk, który następnie przemywa się eterem naftowym lub lekką benzyną i rozpuszcza się na gorąco w organicznych rozpuszczalnikach jak alkohol, aceton, lub dioksan a w końcu wytrąca wodą. Oczyszczony w ten sposób antybiotyk przeprowadza się następnie w znane postacie stosowania leków jak puder, maść, czopki itd.

Ten znany sposób posiada tę wadę, że kulturę powierzchniową trzeba przeprowadzić przez

*) Właściciel patentu oświadczył, że twórcą wynalazku jest Gerhard Bärwald.

wiele kolb szklanych, tak że do ściągnięcia pożywki, sterylizacji, zaszczepienia i oddzielenia starej micelli na drodze filtracji itd. potrzeba dużego nakładu pracy, wysokiego nakładu materiałowego i kosztów, a przede wszystkim dużych powierzchni produkcyjnych, w których panują uregulowane warunki.

Te wymienione czynniki, względnie związane z tym nakłady techniczne powodują powstawanie wysokich kosztów. Do tego dochodzi to, że nie zawsze możliwe jest ściśle kontrolować i sterować procesem fermentacyjnym przez długi okres hodowli kultury trwającej 28 dni, ponieważ każdy zamknięty system biologiczny posiada swoje własne cechy. Poza tym sposób jest szczególnie niekorzystny, ponieważ antybiotyki trzeba ekstrahować dopiero z micelli, przy czym mogą powstawać straty na skutek niecałkowitej ekstrakcji. Ponieważ micella zawiera stosunkowo małe ilości antybiotyku, wobec tego w tych warunkach ekstrakcja w stosunku do osiągniętej wydajności jest bardzo pracochłonna. Również znana jest wzmianka o sposobie podpowierzchniowej hodowli kultur. Doświadczenia w tym kierunku nie doprowadziły jednak do żadnego wyniku, tak że trzeba stwierdzić, że dotychczas nie został opisany sposób wytwarzania tego antybiotyku metodą podpowierzchniową.

Zadaniem wynalazku jest usunięcie opisanych wad występujących w znanych sposobach wytwarzania tego antybiotyku.

Stwierdzono, że przy zastosowaniu jako materiału do szczepienia specjalnego szczepu *Penicillium* wyhodowanego w dowolny znany sposób, który dodaje się w ilości około 5% jako inokulum do kultury głównej, osiąga się przy dobrym napowietrzaniu i wielodniowym mieszaniu zaszczepionego roztworu kultury w temperaturze około 24–30°C rozpad rozłożycie rosnącej micelli, przy czym następuje on po około 8 dniach i prowadzi do uwolnienia i wytrącenia antybiotyku do roztworu hodowli.

Stwierdzono poza tym, że jako inokulum dla następnej hodowli głównej można z powodzeniem stosować część odbudowanej hodowli głównej, która składa się z resztek micelli i zarodników.

Roztwór hodowli — po skończonej hodowli oddziela się przez filtrację, odwirowanie lub odstawienie od części stałych i odrzuca. Te stałe części składają się zasadniczo z wytrąconego antybiotyku jak też z resztek micelli, nierozpuszczalnych soli i produktów odbudowy biał-

ka. W ten sposób otrzymuje się znacznie aktywniejszy produkt pośredni, aniżeli przedstawia go stara micella z produkcji powierzchniowej. Przez rozkład micelli pozostałość jest stosunkowo mała, przez co zostaje ułatwione otrzymanie stosunkowo czystego produktu.

Stwierdzono wreszcie, że można osiągnąć daleko wyższą wydajność, jeżeli roztwór hodowli po zaczynającym się rozkładzie micelli spuści się ze zbiornika dla kultury do dużych naczyń zapasowych i przeprowadzi autolizę w optymalnych warunkach specyficznych fermentów, aż do całkowitego rozkładu części micelli. Przeróbkę oddzielonych substancji stałych, które praktycznie składają się tylko jeszcze z antybiotyku, produktów odbudowy białka, soli nierozpuszczalnych i innych prowadzi się w opisywany sposób.

Według wynalazku inna możliwość przeróbki polega na tym, że oddzielony nieoczyszczony antybiotyk rozpuszcza się w roztworze alkalicznym, roztwór uwalnia znanymi sposobami od stałych części, a z wstępnie oczyszczonego roztworu wydziela się antybiotyk przez adsorpcję, zobojętnienie lub wytrącanie z rozpuszczalnikami nierozpuszczalnymi w wodzie.

Przez porównawcze badanie znanego antybiotyku zawierającego 1,4-dwu-(p-hydroksyfenylo) - 2,3 - dwu - izonitrylo - butadien - (1,3) z antybiotykiem wytworzonym sposobem według wynalazku stwierdzono jednakość czynności biologicznej. Również właściwości fizyczne i chemiczne są takie same.

Powyższe przykłady objaśniają bliżej sposób według wynalazku.

Przykład I. Materiał zarodnikowy specjalnego szczepu *Penicillium* hoduje się po przejściu przez agar na prosie w temperaturze 27°C i po 10-dniowej hodowli stosuje do szczepienia po 10 ml roztworu pożywki, np. Czapek—Doxa w hodowli wstrząsanej. Tak otrzymaną silnie rozmnożoną hodowlę wstępną dodaje się w ilości 5% jako inokulum do 10 l hodowli pośredniej i z tego po dobrym rozwoju stosuje 5 l do zaszczepienia 100 l hodowli głównej. Roztwór hodowli głównej jest taki sam jak roztwór pożywki stosowany w sposobie Emersa. W temperaturze 27°C przy energicznym mieszaniu i napowietrzaniu w stosunku 1 : 1 osiąga się po około 8 dniach rozkład micelli, po czym można fermentację przerwać. Zanieczyszczony antybiotyk wytrącony z roztworu hodowli oddziela się od ciekłych składników

roztworu pożywki na drodze sączenia, wirowania lub odstania i oczyszcza znanymi sposobami. Wydajność czystego kompleksu antybiotyku (X, Y, Z) wynosi 60 g na 100 litrów roztworu pożywki.

Przykład II. Przy wytwarzaniu materiału do zaszczepiania i przy fermentacji postępuje się tak jak w przykładzie I, jednak po rozpoczętym rozpadzie micelli, który następuje po około 5 dniach odprowadza się hodowlę podpowierzchniową i poddaje dalszej autolizie w naczyniu zapasowym, która prowadzi do całkowitego rozpadu micelli. Oddzielenie i przeróbka następuje jak w przykładzie I.

Przykład III. W procesie fermentacji i przeróbki postępuje się jak w przykładzie I lub II, z tą różnicą, że części micelli czynnej hodowli głównej stosuje się jako inokulum do następnej hodowli.

Przykład IV. W celu otrzymania antybiotyku zanieczyszczonego produktami odbudowy micelli względnie białka, nierozpuszczalnymi solami i innymi postępuje się jak w przykładach I, II lub III. Ten zanieczyszczony antybiotyk rozpuszcza się przez zalkalizowanie pozostałości, roztwór oddziela się od stałych składników a produkt surowy wzbogaca przez zobojętnienie, adsorbację lub wytrząsanie z rozpuszczalnikiem nierozpuszczalnym w wodzie.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania antybiotyku zawierającego 1,4 -dwu-(p-hydroksyfenylo) - 2,3 -

dwu-izonitrylo-butadien-(1,3), znamieny tym, że hoduje się kulturę specjalnego szczepu *Penicillium* metodą podpowierzchniową aż do rozpadu masy micelli, następnie antybiotyk uwalniający się w czasie rozpadu micelli i wytwarzający się w roztworze hodowli oddziela się razem z resztą micelli i innymi stałymi substancjami z roztworu hodowli i poddaje chemicznej przeróbce lub hodowlę odprowadza się do zbiornika zapasowego od chwili rozpadu micelli, przechowuje aż do całkowitej autolizy, a następnie po oddzieleniu roztworu hodowli poddaje dalszej chemicznej obróbce.

2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że antybiotyk wytrącony w roztworze hodowli na skutek rozpadu micelli po odstaniu się w naczyniu do hodowli odpuszcza się w postaci wzbogaconej lub oddziela od roztworu hodowli normalnymi sposobami rozdzielania np. przez odwirowanie, rozpuszcza przez zalkalizowanie, następnie uwalnia od stałych pozostałości i po przesączeniu wstępnie oczyszczonej postaci poddaje dalszej chemicznej obróbce.
3. Sposób według zastrz. 1 i 2, znamieny tym, że część czynnej kultury głównej stosuje się jako inokulum dla roztworu pożywki hodowli głównej następnego wsadu tanku fermentacyjnego.

VEB Arzneimittelwerk Dresden

Zastępca: mgr Józef Kamiński
rzecznik patentowy