



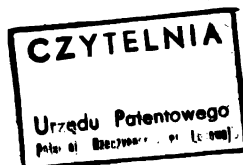
Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 82 12 02 (P. 239327)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 84 07 30

Opis patentowy opublikowano: 1987 01 15



Int. Cl.³ C12P 19/62

Twórcy wynalazku: Marek Biedrzycki, Zuzanna Kowszyk-Gindifer, Piotr Chmielnicki, Zofia Płóciennik, Maria Horodecka, Halina Dahlig, Wiesław Drzewiński, Jerzy Szymański, Mieczysław Wawrzyniewicz, Witold Szmigiel-ski

Uprawniony z patentu: Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfar”,
Warszawa (Polska)

Sposób izolowania polifunginy z hodowli wysokowydajnego mutanta szczepu *Streptomyces noursei* var. *polifungini*

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób izolacji polifunginy z grzybni uzyskanej po przesączeniu brzezczi fermentacyjnej, wytworzonej przy użyciu wysokowydajnego mutanta nr R 851/26/77, otrzymanego sposobem wg opisu patentowego nr 87 664, szczepu *Streptomyces noursei* var. *polifungini* ATCC 21581, na pożywce, w której jako jedyne źródło węgla stosowano olej sojowy wg opisu patentowego nr 93 436.

Sposób izolowania polifunginy z brzeczki macierzystego szczepu *Streptomyces noursei* var. *polifungini* ATCC 21581, wg opisu patentowego nr 71 259, dotyczył wyodrębniania tego antybiotyku z brzeczki uzyskanych na podłożu zawierającym jako źródło węgla glukozę i skrobię ziemniaczaną. Sposób ten okazał się nieprzydatny w przypadku izolowania polifunginy z brzeczki uzyskanych przy użyciu tego szczepu i tłuszczów roślinnych oraz zwierzęcych jako jedyne źródła węgla wg opisu patentowego nr 81 600, a tym bardziej przy użyciu nowego, różnego od szczepu macierzystego, mutanta R 851/26/77 tego szczepu.

Znany sposób izolowania polifunginy polegał na przemywaniu odsączonej grzybni wodą, a następnie acetonem i ekstrahowaniu zawartego w niej antybiotyku metanolem i w końcowym etapie na oczyszczaniu surowego osadu antybiotyku przez odmywanie go rozpuszczalnikami organicznymi lub ich roztworami wodnymi.

Przemywanie grzybni acetonem przed ekstrakcją

2

nie usuwa jednak w dostatecznym stopniu zanieczyszczeń, które przechodzą następnie do ekstraktów metanolowych. Opisana metoda ekstrakcji samym metanolem była niekorzystna, gdyż ponadto wymagała jeszcze stosowania dużych objętości rozpuszczalnika, co prowadziło do zmniejszonego stężenia antybiotyku w ekstraktach, przy czym ekstrakty te zawierały oprócz antybiotyku zanieczyszczenia z grzybni nie usunięte acetonem.

10 Opracowano nowy sposób izolacji polifunginy stanowiący istotę niniejszego wynalazku, który to sposób pozwala na otrzymywanie antybiotyku o właściwej czystości i z dobrą wydajnością.

Sposobem wg wynalazku wydzieloną z brzeczki 15 fermentacyjnej grzybnię, przemytą wodą, traktuje się roztworem dwóch rozpuszczalników organicznych, w tym jednego mieszającego się z wodą, jak metanol lub tetrahydrofuran i drugiego nie mieszającego się z wodą, jak chlorowcopochodne alkanów i alkenów, np. chlorek metylenu, czterochloroetylen, węglowodory alifatyczne i aromatyczne, np. eter naftowy, toluen, estry, np. octan butylu, ketony, np. keton metyloizobutylový, alkohole, np. butanol. Najkorzystniejszym okazał się roztwór metanolu i czterochloroetyleny w stosunku 1:1 obj/obj, 20 który usuwa większość zanieczyszczeń, w tym również kwasy tłuszczowe wytworzone obok polifunginy w procesie biosyntezy.

25 Z tak przygotowanej grzybni ekstrahuje się polifunginę metanolowodnym roztworem CaCl_2 w

takiej ilości aby 1–10 moli CaCl_2 przypadło na 1 mol antybiotyku, zawierającym 2–30% wody. Wobec znacznie lepszej rozpuszczalności kompleksu wapniowego polifunginy niż samej polifunginy uzyskuje się wysokie stężenie antybiotyku w ekstraktach, 3–4 razy wyższe niż przy stosowaniu metanolu bez CaCl_2 . Ponadto stwarza to możliwość uzyskiwania tych stężeń w środowisku uwodnionego metanolu.

Zmniejszenie zawartości wody w roztworze metanolowym oraz zwiększenie ilości CaCl_2 od wyżej podanych, prowadzi wprawdzie do zwiększenia szybkości ekstrakcji lecz pogarsza jej selektywność, ponieważ równolegle z ekstrakcją polifunginy ekstrahowane są sole wapniowe kwasów tłuszczowych. Sole te są nierozpuszczalne przy zawartości wody 20 do 30% w metanolowym roztworze kompleksu polifunginy z CaCl_2 . Zawartość tę uzyskuje się przez odparowanie metanolu z ekstraktów lub przez dodanie wody, co wiąże się z oznaczaniem zawartości wody w każdym z ekstraktów. Przy tej zawartości wody w ekstraktach wytrącają się sole wapniowe kwasów tłuszczowych.

Kompleks wapniowy polifunginy rozkłada się do czystej polifunginy pod wpływem wody, gdy zawartość jej w roztworze metanolowowodnym przekracza 30%. Stąd konieczność zachowania zawartości wody 20–30% na etapie wytrącania soli wapniowych kwasów tłuszczowych. W tym zakresie zawartości wody kompleks wapniowy polifunginy jest dobrze rozpuszczany w roztworze metanolowowodnym, natomiast sole wapniowe kwasów tłuszczowych wytrącają się w postaci osadu.

Zwiększając zawartość wody w roztworze krystalizacyjnym do ponad 30% kompleks wapniowy polifunginy rozkłada się do wolnej polifunginy, która ulega wytrąceniu. Sole wapniowe są kompleksowane w formie łatwo rozpuszczalnych związków w ługach pokrystalizacyjnych w zakresie wartości pH 4–7. W wyniku tego sposobu postępowania uzyskuje się preparaty polifunginy o śladowej zawartości wapnia i wysokiej aktywności biologicznej.

Sposobem wg wynalazku krystalizację polifunginy z przesączu uzyskanego po odsączeniu wytrąconych soli kwasów tłuszczowych, prowadzi się w środowisku pH 4–7, uzyskanym przez dodanie kwasów kompleksujących wapń, takich jak kwas cytrynowy, winowy, wersenowy oraz ich buforów. Z uzyskanego w ten sposób roztworu o stężeniu antybiotyku około 150 tys. j/ml, krystalizuje się polifunginę dodając do niego wodę lub oddestylowując metanol tak, aby zawartość wody w mieszaninie krystalizacyjnej wynosiła korzystnie objętościowo 66–80%, ewentualnie szczepiąc ten roztwór krystalicznym preparatem antybiotyku. Proces krystalizacji prowadzi się w temperaturze 0° do $+5^\circ\text{C}$, osad odsacza, przemycwa acetonem i suszy pod próżnią w temperaturze pokojowej.

Stosując wyżej opisaną metodę wg wynalazku, oprócz korzystnego zwiększenia wydajności procesu, uzyskuje się także wysoką czystość produktu. Przemycwanie grzybni, zwłaszcza metanolowym roztworem czterochloroetyleny, najskuteczniej usuwa tłuszcze, barwniki i kwasy tłuszczowe ułatwiając dalszy przebieg procesu izolacji, zaś stosowanie

metanolowego roztworu CaCl_2 , zamiast samego metanolu, daje wysokie stężenie antybiotyku w ekstraktach i w istotny sposób zmniejsza objętość ekstraktów, w wyniku czego uzyskuje się znaczne uproszczenie procesu izolacji polifunginy w skali przemysłowej.

Przykład I. 250 g grzybni o aktywności 300 tys. j/g, otrzymanej w procesie sączenia brzezki fermentacyjnej, przemycwa się wodą, zawiesza w 500 ml roztworu czterochloroetyleny w metanolu (1:1 obj/obj), a następnie koryguje pH do 6,6–7,0 przy użyciu 10% roztworu wodnego kwasu cytrynowego lub trójetyloaminy i miesza się intensywnie w ciągu 2 godzin, sączy, po czym przemycwa 200 ml metanolu. Tak odmytą grzybnę ekstrahuje się trzema porcjami po 400 ml metanolu zawierającego odpowiednio 5,2 i 1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, następnie przemycwa się 200 ml metanolu. Ekstrakty i przemycwki łączy się, odparowuje pod próżnią w temperaturze $+25^\circ\text{C}$ do uzyskania roztworu o zawartości wody 25–30%. Wytrącony w czasie odparowania osad soli wapniowych kwasów tłuszczowych odsacza się, wartość pH przesączu koryguje 10% roztworem kwasu cytrynowego do pH 5,5, następnie dodaje się 0,5 g krystalicznej polifunginy i całość odparowuje w próżni w temperaturze $+25^\circ\text{C}$ do takiej objętości, aby zawartość wody wynosiła 33–35% w stosunku do zawartości metanolu, a następnie dodaje się takie ilości wody, aby uzyskać trzykrotny nadmiar wody w stosunku do metanolu; pH koryguje się do wartości 6,8 przy użyciu trójetyloaminy i prowadzi krystalizację antybiotyku w ciągu 5 godzin w temperaturze $+4^\circ\text{C}$. Osad sączy się, zawiesza w acetonie w ilości 1 g osadu w 3 ml i po odsączeniu przemycwa 50 ml acetonu. Osad suszy się pod próżnią w temperaturze pokojowej do zawartości wody nie wyższej niż 5%. Otrzymuje się 8,5 g osadu o mocy 7000 j/mg (oznaczenie mikrobiologiczne), co stanowi 74,6% wydajności w przeliczeniu na zawartość antybiotyku w grzybni.

Przykład II. 250 g przemytej wodą grzybni o aktywności 350 000 j/g zawiesza się w 500 ml roztworu czterochloroetyleny w metanolu, koryguje pH 10% roztworem wodnym kwasu cytrynowego lub trójetyloaminą do 6,6–7,0 i miesza się intensywnie w ciągu 2 godzin, a następnie sączy i przemycwa grzybnę 150 ml metanolu. Tak odmytą grzybnę ekstrahuje się 300 ml metanolu po uprzednim dodaniu do niego 10 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. Ekstrakcję powtarza się jeszcze dwukrotnie używając za każdym razem 300 ml metanolu zawierającego odpowiednio 2 i 1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, a następnie przemycwa się wyekstrahowaną grzybnę 300 ml metanolu. Ekstrakty i przemycwki łączy się, uzupełnia wodą do stężenia 25%, sączy od osadu soli wapniowych i koryguje pH kwasem wersenowym do 5,0, sączy ponownie i dodaje taką ilość wody do przesączu, aby uzyskać trzykrotny nadmiar wody w stosunku do metanolu. Krystalizację prowadzi się 5 godzin w temperaturze $+5^\circ\text{C}$. Osad sączy się, zawiesza w acetonie w ilości 1 g osadu w 3 ml, a po odsączeniu przemycwa się 50 ml acetonu. Osad suszy się pod próżnią w temperaturze pokojowej do zawartości wody nie wyższej niż 5%. Otrzymuje się

8,9 g osadu o mocy 6900 j/mg (oznaczenie mikrobiologiczne), co stanowi 70,2% wydajności w przeliczeniu na zawartość antybiotyku w grzybni.

Przykład III. 250 g grzybni o aktywności 280 000 j/g zawieszają się po uprzednim przemyciu wodą, w 500 ml roztworu toluenu w tetrahydrofuranie (1,5:1 obj/obj) i miesza się przez godzinę w pH wartości 4,0—4,2 uzyskanym po zakwaszeniu kwasem cytrynowym. Grzybnię sączy się i przemycuje 100 ml tetrahydrofuranu. Tak odmytą grzybnię ekstrahuje się czterema porcjami po 300 ml metanolu zawierającego odpowiednio 3, 2, 1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ i dodaje do każdego ekstraktu wodę do zawartości 30%, po czym sączy się osad wytrąconych soli wapniowych kwasów tłuszczowych. Połączone ekstrakty zakwasza się kwasem winowym do wartości pH 4,5 i odparowuje do uzyskania czterokrotnego nadmiaru wody w stosunku do metanolu, a następnie koryguje pH trójetanoloaminą do pH 6,5. Krystalizację antybiotyku prowadzi się 5 godzin w temperaturze 0°C. Osad sączy się i zawieszają w acetonie w ilości 1 g osadu w 3 ml, a następnie przemycuje 50 ml acetonu. Osad suszy się pod próżnią bez ogrzewania do wartości wody nie wyższej niż 5%. Otrzymuje się 6 g osadu o mocy 7 300 j/mg (oznaczenie mikrobiologiczne), co stanowi 62,2% wydajności w przeliczeniu na zawartość antybiotyku w grzybni.

Przykład IV. 250 g przemycanej wodą grzybni o aktywności 350 000 j/g zawieszają się w 500 ml tetrahydrofuranu, koryguje wartość pH 10% roztworem wodnym kwasu cytrynowego lub trójetanoloaminą do 6,6—7,5 i miesza intensywnie w ciągu 2 godzin, a następnie sączy i przemycuje grzybnię 150 ml metanolu. Tak odmytą grzybnię ekstrahuje się 300 ml metanolu, po uprzednim dodaniu do niego 10 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. Ekstrakcję powtarza się jeszcze dwukrotnie używając do ekstrakcji po 300 ml metanolu zawierającego po 5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$. Ekstrakty łączy się, dodaje wodę do zawartości 25%, odsącza wytrącony osad soli wapniowych kwasów tłuszczowych. Ekstrakty zakwasza się 5% wodnym buforem cytrynowym o pH 4,0 do wartości pH 5,0, po czym dodaje się taką ilość wody, aby uzyskać jej dwukrotny nadmiar w stosunku do metanolu

i prowadzi krystalizację w czasie 5 godzin w temperaturze +4°C. Następnie osad sączy się, zawieszają go w acetonie w proporcji 1 g mokrego osadu w 3 ml acetonu, a po odsączeniu przemycuje 50 ml acetonu. Osad suszy się pod próżnią w temperaturze pokojowej. Otrzymuje się 7,8 g polifunginy o aktywności 7200 j/mg (oznaczenie mikrobiologiczne) co stanowi 65% wydajności w przeliczeniu na zawartość antybiotyku w grzybni.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób izolacji polifunginy z hodowli wysokowydajnego mutantu R 851/26/77 szczepu *Streptomyces noursei* var. polifungini ATCC 21581 na pożywce, w której jedynym źródłem węgla jest olej sojowy, polegający na przemyciu grzybni kolejno wodą i rozpuszczalnikiem organicznym i ekstrakcji, znamienny tym, że grzybnię wydzieloną z brzojki fermentacyjnej i przemycaną wodą przemycuje się następnie rozpuszczalnikiem organicznym mieszającym się z wodą, takim jak metanol lub tetrahydrofuran albo mieszaniną rozpuszczalnika mieszającego się z wodą z rozpuszczalnikiem nie mieszającym się z wodą, takim jak chlorowcopochodne alkanów i alkenów, węglowodory alifatyczne i aromatyczne, eter, ketony, korzystnie roztworem metanolu i czterochloroetyleny w stosunku 1:1 obj/obj, po czym z grzybni ekstrahuje się polifunginę metanolewodnym roztworem chlorku wapnia, zawierającym 1—10 moli CaCl_2 na 1 mol antybiotyku oraz 2—30% wody, a następnie z ekstraktu odparowuje się metanol albo dodaje wodę tak, aby zawartość jej wynosiła 20—30%, odsącza się wytrącone sole wapniowe kwasów tłuszczowych, zwiększa zawartość wody powyżej 30%, koryguje pH przesącza do wartości 4—7 kwasem wersenowym, winowym, cytrynowym lub ich buforami i prowadzi krystalizację polifunginy dodając do ekstraktów wodę bądź oddestylowując metanol tak, aby zawartość jej w mieszaninie krystalizacyjnej wynosiła korzystnie objętościowo 60—80%, ewentualnie szczepi roztwór krystalicznym preparatem antybiotyku po czym wytrącony osad antybiotyku odsącza się.