

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

O P I S P A T E N T O W Y 97283

**Patent dodatkowy
do patentu _____**

Zgłoszono: 30.09.74 (P. 174485)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 13.03.76

Opis patentowy opublikowano: 30.12.1978

Int. Cl² C12D 9/20

MKP C12d 9/20

CZYTELNIA

**Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej**

**Twórcy wynalazku: Anna Wilimowska-Pelc, Maria Malicka-Błaszkiwicz, Zofia Olichwier,
Wanda Mejbaum-Katzenellenbogen**
**Uprawniony z patentu. Uniwersytet Wrocławski im. Bolesława Bieruta,
Wrocław (Polska)**

Sposób otrzymywania nizyny w postaci czystej

Dziedzina techniki Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania z produktów, uzyskiwanych przez fermentację znanych pożywek za pomocą drobnoustrojów ze szczepu nizynowotwórczego *Streptococcus lactis*, czystych preparatów nizyny o mocy 40×10^6 jedn./g, z przeznaczeniem dla przemysłu farmaceutycznego jako standard do oznaczania handlowej nizyny oraz do badań nad strukturą i funkcją polipeptydów.

Pod sformułowaniem jednostek w całym opisie wynalazku rozumie się jednostki Readinga.

Stan techniki. Nizyna jest antybiotykiem, wytwarzanym przez szczep *Streptococcus lactis* w logarytmicznej fazie wzrostu i stanowi mieszaninę polipeptydów, które hamują wzrost różnych mikroorganizmów między innymi szczepów *Clostridien*. Dzięki temu nizyna znalazła zastosowanie w przemyśle spożywczym.

Znane dotychczas sposoby wyodrębniania czystej nizyny (Berridge N.J. Biochem. J. 1949, 45, 486; Berridge N.J., Newton G.F., Abraham E.P. Biochem. J. 1952, 52, 529) polegają na frakcjonowaniu. płynnej hodowli *Streptococcus lactis* rozpuszczalnikami organicznymi w środowisku kwaśnym, w wyniku czego uzyskuje się surowy preparat nizyny, który następnie oczyszcza się poprzez frakcjonowanie różnymi stężeniami chlorku sodu w środowisku kwaśnym, a następnie krystalizuje z alkoholu lub też wydziela się metodą rozdziału przeciwpłądowego.

Metoda opisana przez Berridge'a jest pracochłonna, kosztowna i mało wydajna.

Handlowe koncentraty nizyny otrzymuje się według postępowania, przedstawionego w opisach patentowych Wielkiej Brytanii nr 844782 Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2939503 i Polski nr 68835. Postępowanie to polega na wyodrębnieniu nizyny przez wytrącanie białka ze środowiska fermentacyjnego, wypłukaniu nizyny z wytrąconego osadu oraz wypienieniu uzyskanych cieczy zawierających nizynę, a następnie wytrąceniu nizyny z tych cieczy, odwirowaniu osadu i jego suszeniu. Handlowe koncentraty nizyny są sprowadzane do mocy około 1×10^6 jedn./g i zawierają oprócz nizyny chlorek sodu i inne białka, pozbawione aktywności nizynowej.

Istota wynalazku. Celem wynalazku jest uzyskiwanie czystej nizyny z handlowych koncentratów, a zadanie to zrealizowano poprzez opracowanie prostego i szybkiego sposobu, przedstawionego w niniejszym opisie.

Sposobem według wynalazku, otrzymuje się czysty preparat nizyny o mocy 40×10^6 jedn./g z produktu

handlowego, otrzymanego w wyniku stosowania procesu technologicznego, opisanego na przykład w opisie patentowym nr 68835.

Zgodnie z wynalazkiem handlowy koncentrat nizyny, zawierający jako główny składnik chlorek sodu i zanieczyszczenia białkowe oraz nizynę w stanie stałym, zawieszają się w środowisku silnie kwaśnym o $\text{pH} = 1,5 - 2,5$, przez rozmieszanie w takiej ilości $0,02 \text{ N}$ kwasu solnego, aby otrzymać gęstą zawiesinę, którą wprowadza się do worka dializacyjnego i poddaje kilkunastogodzinnej dializie do $0,02 \text{ N}$ kwasu solnego w temperaturze pokojowej celem obniżenia stężenia soli i rozpuszczenia nizyny po czym zawartość worka poddaje się sączeniu na sicie molekularnym o zakresie frakcjonowania 1000 do 10000, w wyniku czego otrzymuje się czysty roztwór nizyny wolny od soli i związków niskocząsteczkowych oraz zanieczyszczeń białkowych. Frakcje, zawierające nizynę po krótkiej dializie do wody destylowanej poddaje się liofilizacji.

Zasadniczą zaletą, wynikającą ze stosowania sposobu otrzymywania nizyny według wynalazku, jest proste i krótkie postępowanie prowadzące do uzyskania preparatu nizyny, wolnego od soli, związków drobnocząsteczkowych i zanieczyszczeń białkowych oraz o aktywności czterdziestokrotnie wyższej od preparatów wyjściowych, a zbliżonej do aktywności nizyny, otrzymanej metodą Beridge'a i wsp. (Berridge N.J., Newton G.F., Abraham E.P., Biochem. J., 1952, 52 529).

Podany niżej przykład wyjaśnia bliżej istotę sposobu według wynalazku.

Przykład. 3 g handlowego koncentratu nizyny z przeznaczeniem do przemysłu spożywczego o mocy około 1×10^6 jedn./g zadaje się 6 ml $0,02 \text{ N}$ kwasu solnego, zawieszają przez rozmieszanie i przenosi się do worka dializacyjnego, po czym dializuje 12 godzin do 4 l $0,02 \text{ N}$ kwasu solnego w temperaturze pokojowej. Zawartość woreczka dializacyjnego przenosi się do probówki wirówkowej i poddaje wirowaniu przy 10000 g przez 10 minut. Płyn nad osadu poddaje się sączeniu molekularnemu na Bio-Gelu P-10 o stopniu granulacji $200 \div 400$ mesh firmy Calbiochem. W tym celu na kolumnę szklaną o wymiarach $150 \times 1,5 \text{ cm}$, wypełnioną uprzednio napęczniałym w wodzie destylowanej bio-Gelem P-10 i zrównoważoną $0,02 \text{ N}$ kwasem solnym, wlewa się całą objętość płynu nad osadu. Do elucji stosuje się $0,02 \text{ N}$ kwas solny i zbiera się około 60 frakcji o objętości 6 ml przy szybkości wypływu 12 ml/godzinę . We wszystkich frakcjach oznacza się ilość białka przez pomiar ekstynkcyj w spektrofotometrze przy długości fali 235 i 280 nm. We frakcjach, zawierających nizynę, stosunek ekstynkcyj przy 235 nm do ekstynkcyj przy 280 nm przekracza wartość 10, we frakcjach, zawierających zanieczyszczenia białkowe, stosunek ten przekracza wartość 3.

Na załączonym rysunku zilustrowano opisany przykład i w układzie współrzędnych naniesiono profil elucyjny, uzyskany w wyniku sączenia molekularnego na Bio-Gelu P-10 handlowego preparatu nizyny produkcji polskiej. Na lewej osi rzędnych naniesiono wartość ekstynkcyj E, na prawej osi aktywność nizynową, zaś na osi odciętych kolejne frakcje, wypływające z kolumny.

Frakcje o najwyższej aktywności nizynowej to jest frakcje od 48 do 51 włącznie, zlewano i poddawano 3 godzinnej dializie do 2 l wody destylowanej dwukrotnie zmienianej, po czym je liofilizowano. Uzyskano z 3 g handlowego preparatu nizyny 42 mg preparatu nizyny o mocy 40×10^6 jedn./g z wydajnością 56%.

W czasie licznych prób doświadczalnych w sposób, nie budzący wątpliwości, stwierdzono, że zachowując te same warunki polegające na stosowaniu kolumny o określonej wielkości, określonego sita molekularnego i określonego rozpuszczalnika frakcje o najwyższej aktywności nizynowej wypływają w ściśle określonym czasie.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania nizyny w postaci czystej z n a m i e n n y t y m, że koncentrat handlowy nizyny zawierający jako główny składnik chlorek sodu i zanieczyszczenia białkowe, pochodzące z brzołki pofermentacyjnej, a nizynę w stanie stałym zawieszają się w środowisku silnie kwaśnym o $\text{pH} = 1,5 \div 2,5$, najkorzystniej w $0,02 \text{ N}$ kwasie solnym, dializuje się do środowiska kwaśnego o tej samej kwasowości i oddziela się płyn od osadu, po czym na kolumnę, którą uprzednio wypełnia się sitem molekularnym, najkorzystniej żelem poliakryloamidowym o stopniu granulacji $200 \div 400$ mesh i zakresie frakcjonowania od 1000 do 10000 i równoważy się roztworem o tej samej wartości pH , nanosi się otrzymany płyn oraz roztworem o tej samej wartości pH wymywa się naniesiony na sita materiał, z którego spośród kolejnych frakcji pobiera się tylko frakcje o najwyższej aktywności nizynowej a następnie po około trzygodzinnej dializie do wody poddaje się te frakcje liofilizacji.

