

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

68 275

Patent dodatkowy
do patentu _____

Kl. 12o,25/05

Zgłoszono: 13.IX.1967 (P 122 574)

Pierwszeństwo: _____

MKP C07c 167/10

Opublikowano: 28.XII.1973

CZYTELNI

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Współtwórcy wynalazku: Jadwiga Golonka, Wiesław Lewenstein, Irena Eysymontt,
Wiesława Kotula, Maria Iwaszkiewicz

Właściciel patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego, Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania 11 α -hydroksysterydów

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 11 α -hydroksysterydów serii pregnanu o układzie Δ^4 -3-ketonowym zawierających w położeniu 17 α atom wodoru lub grupę hydroksylową, a w położeniu 17 β ugrupowanie -COCH₃, OH oraz zawierających ewentualnie dodatkowe podwójne wiązanie w pozycji 1-2, polegający na wprowadzeniu metodą mikrobiologiczną do odpowiednich substratów sterydowych grupy hydroksylowej w pozycji 11 α . Związki te są ważnymi produktami pośrednimi w syntezie kortyzonu i jego pochodnych.

Znany sposób wprowadzania grupy hydroksylowej w pozycję 11 α pierścienia sterydowego metodą mikrobiologicznej transformacji polega na zastosowaniu szczepów mikroorganizmów z rodzaju *Rhizopus*, *Aspergillus* i *Cunninghamella* [D.H.Peterson i Murray, J.A.Chem.Soc., 74, 1871, 5933 (1952); Fried i wspóół., J.Am.Chem. Soc., 74, 3962 (1952); N.Shirasaka i N.Tsuruta, Chem.Pharm.Bull. 9, 159 (1961)] oraz szczepów z rodzaju *Abaidia* [L. Sokołowa i wspóół., Mied.Prom. nr 6, 36, (1966); J. Protiva, Schwarz i Syhora, opis patentowy CSSR nr 116082]. Jako efekt końcowy biotransformacji za pomocą tych szczepów otrzymywano niewielkie ilości produktu, a najczęściej mieszaninę kilku produktów, wymagającą skomplikowanego rozdzielania na drodze chemicznej.

Znany jest również sposób polegający na zastosowaniu szczepu *Metarrhizium anisopliae* do 11 α -hydroksylacji progesteronu i 3,5-cyklo-6 β -hydroksyprognan-20-onu [Y. Kurosawa, J.Agr.Chem.Soc.Japan, 31, 478 (1957)] oraz progesteronu (M. Nishikawa i wspóół., opis patentowy japoński

2

nr 426 z 1959 r.), które to związki nie mieszczą się jednak w omawianej grupie związków.

Ponadto znany jest również sposób wprowadzania grupy hydroksylowej w położeniu 11 pierścienia sterydowego za pomocą bakterii z rodzaju *Pseudomonas* lub *Serratia*, jednakże jak wynika z przykładów grupa hydroksylowa wchodzi w położenie 11 β przy równoczesnej dehydrogenacji w pozycji 1-2 (opisy patentowe szwajcarskie nr 381226 i 385204).

Stosunkowo najlepsze wyniki 11 α -hydroksylacji sterydów uzyskano przy zastosowaniu następujących szczepów: *Paenaeolus campanulatus* (opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 3149050), *Fusarium equiseti* var. *bullatum* (opis patentowy brytyjski nr 896913) oraz *Glomerella cingulata* (opis patentowy St. Zjedn. Am. nr 2985563). Niewielkie stężenie substratu sterydowego wynoszące zaledwie do 0,5 g/l brzezki w znacznym stopniu ogranicza zastosowanie przemysłowe dwóch pierwszych szczepów. Również metoda mikrobiologicznej 11 α -hydroksylacji przy zastosowaniu szczepu *Glomerella cingulata*, choć dopuszcza większe stężenie substratu (do 1 g/l brzezki), wykazuje istotne braki i niedogodności, jak długi czas przygotowywania hodowli wynoszący 24-36 godzin oraz czas trwania procesu transformacji wynoszący 24-30 godzin.

Stwierdzono, że zastosowanie nowego szczepu *Metarrhizium velutinum* M-6 w konwencjonalnej metodzie 11 α -hydroksylacji w odróżnieniu od znanych i stosowanych do tego celu szczepów umożliwia selektywne, stereospecyficzne otrzymanie produktu oraz zwiększenie stężenia substratu do około 1,5 g/l brzezki, przy znacznym skróceniu czasu przygotowania hodowli i czasu transformacji.

Według wynalazku związek sterydowy serii pregnanu o układzie Δ^4 -3-ketonowym zawierający w położeniu 17 α atom wodoru lub grupę hydroksylową, a w położeniu 17 β ugrupowanie $-\text{COCH}_2\text{OH}$ lub $-\text{COCH}_2\text{OAc}$, w którym Ac oznacza acyl o 2–4 atomach węgla, oraz zawierający ewentualnie dodatkowe podwójne wiązanie w pozycji 1–2, lecz nie zawierający grupy hydroksylowej w położeniu 11 α , poddaje się działaniu szczepu *Metarrhizium velutinum* M–6 w warunkach aerobowych sposobem konwencjonalnym, po czym surowy produkt zawierający w pozycji 11 α grupę wodorotlenową wyodrębnia się w znany sposób, np. przez ekstrakcję i ewentualnie oczyszczanie.

Nowy szczep *Metarrhizium velutinum* oznaczony symbolem M–6 i należący do klasy Fungi Imperfecti, rzędu Moniliales, rodziny Moniliaceae, wyizolowano z gleby i opracowano na drodze selekcji z dzikiego szczepu macierzystego w Pracowni Bakteriologicznej Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie. Opis nowego gatunku podali A. Borowska, J. Golonka i W. Kotula w *Acta Mycologica*, VII, 1(1971).

Szczep *Metarrhizium velutinum* M–6 na pożywce Czapek Doxa tworzy kolonie początkowo białe, po 12 dniach zielonoszare z jaśniejszym żółtawym marginesem, niskie o aksamitnej powierzchni; po 12 dniach kolonie osiągają średnicę 4 cm. Odwrotna strona pożywki początkowo bezbarwna wkrótce przybiera jaskrawożółte lub żółto-oliwkowe zabarwienie. W starszych kulturach kolonie mają zabarwienie intensywnie zielonoszare.

Grzybnia wegetatywna złożona z bezbarwnych, falistych strzępek ze zgrubieniami. Komórki jej o wymiarach 12,5–20 $\times$ 5,5–8 μ zawierają liczne krople tłuszczu.

Konidiofory wyrastają pojedynczo lub w skupieniach tworząc pędzłowate pseudosporodochia; konidiofory pojedyncze są nierozgałęzione, wyprostowane, 7,5–12,5 $\times$ 2–2,5 μ , często pod szczytem lekko rozszerzone, bez przegrody lub z jedną przegrodą poprzeczną; często spotykane, nierozgałęzione konidiofory dźwigają na szczycie 2–6 fialid. Występują również konidiofory typu *Penicillium* z fialidami I i II rzędu, położonymi okółkowo, bądź konidiofory kilkakrotnie rozgałęzione do 50 μ wysokie. Pseudosporodochia 150–300 $\times$ 30–50 μ tworzy się wskutek wyrastania ściśle obok siebie kilku obficie rozgałęzionych konidioforów. Szczytowe fialidy tych konidioforów, o wymiarach 9,5–12 $\times$ 2,5 μ , wyrastają blisko siebie i skierowane są pionowo ku górze. Długie łańcuchy fialospor tworzące się na ich szczytach położone są równolegle i ściśle do siebie przylegają. Fialidy cylindryczne lekko zwężające się ku szczytowi mają wymiary 7,7–14 $\times$ 2–3,5 μ .

Fialospory są początkowo bezbarwne, w starych kulturach w masie zielonawe, jednokomórkowe, cienkościenne, gładkie, 6–7 $\times$ 2,5–3 μ , podłużnoowalne do cylindrycznych, z zaokrąglonymi końcami bądź o zwężonym i ściętym jednym końcu, niekiedy lekko wygięte. Tworzą długie łańcuchy, które nie rozpadają się nawet w bardzo starych kulturach.

Metarrhizium velutinum M–6 można inkubować w temperaturze 20–32°C, najwyższy wzrost osiąga się w temperaturze 28–30°C. Nie rozkłada celulozy.

W literaturze mikologicznej znane są opisy tylko trzech gatunków z rodzaju *Metarrhizium*: *Metarrhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin 1879, *Metarrhizium album* (Petch) 1931 oraz *Metarrhizium brunneum* (Petch) 1935. Z opisu *Metarrhizium album* (Petch) 1931 wynika, że jest to gatunek wyraźnie różny od szczepu według wynalazku, dlatego nie brano go pod uwagę przy dalszych badaniach porównawczych.

Przeprowadzono szczegółowe porównanie *Metarrhizium*

anisopliae z CBS Baarn i z WSR w Szczecinie oraz *Metarrhizium brunneum* z CBS Baarn z nowym wyizolowanym gatunkiem według wynalazku. Grzyby hodowano na trzech podłożach (Czapek-Doxa, agar owsiany i ziemniaczany) w wielokrotnych powtórzeniach w temp. 28° i pokojowej.

Oba szczepy *Metarrhizium anisopliae*, poza różnicą w wymiarach fialid oraz fialospor nie wykazują istotniejszych różnic między sobą. *Metarrhizium anisopliae* (o małych wymiarach fialospor) jest gatunkiem najbardziej zbliżonym do szczepu obecnie wyizolowanego. Różni się od niego zabarwieniem i strukturą kolonii, wielkością i stanem rozproszenia pseudosporodochiów, wymiarami fialid oraz kształtem i wymiarami fialospor. Wyizolowany grzyb według wynalazku reprezentuje nowy gatunek z rodzaju *Metarrhizium*. W tablicy podano zestawienie cech charakterystycznych badanych szczepów. Według wynalazku substrat sterydowy miesza się z hodowlą szczepu *Metarrhizium velutinum* M–6 albo z jej enzymatycznymi produktami przy stałym doprowadzaniu tlenu, a po zakończeniu hydroksylacji wyodrębnia się produkt przez ekstrakcję brzeczki lub odsączenie razem z grzybnia, po czym wydzielony produkt ewentualnie oczyszcza się w znany sposób.

Transformację wymienionych sterydów do 11 α -hydroksypochodnych można przeprowadzić bezpośrednio w hodowli głębiniowej *Metarrhizium velutinum* M–6, w zawiesinie tego mikroorganizmu zebranego z hodowli głębiniowej bądź powierzchniowej, za pomocą oddzielonych zarodników, albo też wobec preparatów enzymatycznych otrzymanych z mikroorganizmu, bądź jego zarodników zawierających 11 α -hydroksylazę sterydową.

Przy zastosowaniu szczepu według wynalazku przemiana przebiega przy wartości pH 4–9, najlepiej 5,6–7,0. Hodowlę można prowadzić systemem periodycznym lub ciągłym. Przy hodowli głębiniowej stosuje się mieszanie, najczęściej mieszanie wirowe.

Związek sterydowy można wprowadzić do hodowli jako rozdrobnioną substancję stałą lub w postaci zawiesiny, a najlepiej roztworu w rozpuszczalnikach organicznych. Jako rozpuszczalniki stosuje się alifatyczne alkohole, ketony, estry i amidy kwasowe, np. metanol, aceton, dwumetyloformamid. Można również stosować roztwór lub zawiesinę związku sterydowego uzyskaną w trakcie syntezy lub biosyntezy.

Hodowlę prowadzi się w warunkach aerobowych w kolbach umieszczonych na trzęsawce, co zapewnia równomierne silne mieszanie, a tym samym stały dopływ powietrza, które jest niezbędne zarówno do rozwoju mikroorganizmu, jak i utleniania substratu. Hodowlę można również prowadzić w różnego typu i wielkości fermentorach zaopatrzonych w odpowiednie dysze wtryskujące powietrze z dna aparatu oraz mieszadła umożliwiające dokładne rozprowadzenie pęcherzyków powietrza w płynnej hodowli.

Ekstrakt zawierający produkt transformacji może być zagęszczony do małej objętości lub odparowany do sucha a następnie oczyszczony przy pomocy różnych metod, z których najbardziej znanymi są: chromatografia i krystalizacja.

Hodowlę szczepu można prowadzić w znany sposób metodą powierzchniową lub głębiniową, przy czym stosuje się podłoża o różnych źródłach węgla i azotu. Źródłem węgla może być glukoza, sacharoza lub inne przyswajalne cukry, a także kwasy organiczne albo ich połączenia. Azot można dostarczać w postaci soli nieorganicznych, biopreparatów takich jak pepton, hydrolizat kazeiny, wyciąg mięsny, wyciąg słodowy, namok kukurydziany, mąka sojowa i ekstrakt drożdżowy.

T a b l i c a

Zestawienie cech charakterystycznych *M. anisopliae*, *M. velutinum* i *M. brunneum*

Pożyw- ka		<i>M. anisopliae</i>	<i>M. velutinum</i>	<i>M. brunneum</i>
Czapek-DOXA	kolonie (14 dni)	czarno-zielono-oliwkowe, niskie, prawie skorupiaste	zielono-szare z żółtym marginesem, aksamitne	żółtawokremowe, z przewagą pu- szystej płonnej grzybni powie- trznej
	rewers ko- lonii	bezbarwny (WSR) lub żółto- oliwkowy (CBR)	jaskrawożółty do żółtooliwko- wego	bezbarwny lub cytrynowożółty
	pseudospo- rodochia fialidy	wyprostowane zrastające się z sobą, 100–250 × 50–100 μ 15–20 × 3–4 μ (WSR), 10–12 × 3–3,5 μ (CBR)	wygięte lub proste, oddzielne, 150–300 × 30–50 μ 7,5–14 × 2–2,5 μ	tworzą się sporadycznie, 150–200 × 20–40 μ 9–12 × 2–3 μ
	fialosporę	długoovalne, fasolkowate, eli- psoidalne, 10–16 × 3–4 μ (WSR), 5–8 × 2–3 μ (CBS)	długoovalne, cylindryczne, 6–8 × 2,5–3 μ	długoovalne, cylindryczne, 5–8 × 2–2,5 μ
ziemiaczana	kolonie (14 dni)	czarno-zielono-oliwkowe, zwarte (WSR) bądź z obfitą białą płon- ną grzybnia powietrzną (CBS)	zielono-szare z odcieniem oliwko- wym, jaśniejszy margines, lekko puszyste	białożółtawe, obfita biała płonna grzybnia powietrzna
	rewers ko- lonii	bezbarwny (WSR), brązowawy (CBS)	żółtawy lub z odcieniem oliwko- wym, ale tylko w centrum	żółtawobrzązowawy
	pseudospo- rodochia fialidy	100–200 × 100–150 μ (WSR); 100–150 × 80–100 μ (CBS) 17,5–20 × 3–4 μ (WSR), 10–13 × 2,5–3,5 μ (CBS)	100–150 × 50–70 μ 10–15 × 2,5–3 μ	70 × 580 μ (nieliczne) 12,5–15 × 2,5–3 μ
	fialosporę	10–12,5 × 2,5–3,5 μ (WSR) 5–7,5 × 2–2,5 μ (CBS)	6–8 × 2,8–3 μ	6–12,5 × 2,5–3 μ
owśiana	kolonie (14 dni)	czarno-zielono-oliwkowe, luźne (WSR), z obfitą białą grzybnia powietrzną (CBS)	jasnozielono-szare, z jaśnie- szym marginesem, welwetowate	białożółtawe (wzrost bardzo skąpy)
	rewers ko- lonii	bezbarwny (WSR) lub żółtawy (CBS)	bezbarwny lub żółtawy	bezbarwny lub lekko żółtawy
	pseudospo- rodochia fialidy	150–250 × 80–100 μ (WSR), 100–150 × 80–100 μ (CBS) 15–20 × 2,5–3,7 μ (WSR), 8–15 × 2,5–3,5 μ (CBS)	150–200 × 50–60 μ 12,5–16 × 2,5–3,8 μ	nieliczne, 100 × 30 μ 12–17 × 2,5–3,5 μ
	fialosporę	10–15 × 2,5–3 μ (WSR), 4,5–7,5 × 2–2,5 μ	6–8(10) × 2,5–3,5 μ	6–10 × 2,5 μ

Dla szybkiego wzrostu i hodowli można dodawać fosfora-
ny. Niezbędne sole mineralne i witaminy zawarte są w wy-
mienionych biopreparatach w ilościach wystarczających dla
optymalnego wzrostu.

Można stosować podłoża płynne według Sabouraud, np.
1% peptonu i 2% maltozy lub 1% peptonu, 4% glukozy,
0,35% ekstraktu mięsnego i 0,75% chlorku sodowego, podło-
że według Raulin-Thoma i według Czapka i Czapek-Doxa,
a najkorzystniej podłoże IFB, opracowane w Pracowni Bak-
teriologicznej Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie
o następującym składzie

ekstrakt drożdżowy	0,25%
pepton	0,4 %
KH ₂ PO ₄	0,4 %
brzeczka słodowa o gęstości 8,7° Blg	10% v/v
woda	do 100%
Po sterylizacji wartość pH wynosiła	6–6,5.

Substraty sterydowe, które mogą być poddane procesowi
fermentacji przy użyciu *Metarrhizium velutinum* M-6, jest
pregnen-4-diol-17α, 21-dion-3,20 czyli substancja S Reichstei-
na, 21-octan substancji S Reichsteina, pregnen-4-ol-21-dion-
-3,20 czyli dezoksykortykosteron oraz pregnadien-1,4-diol-
-17α,21-on-3,20 czyli Δ¹-substancja S Reichsteina.

Szczególnie korzystne wyniki uzyskuje się poddając 11α
-hydroksylacji pregnen-4-diol-17α, 21-dion-3,20 czyli sub-
stancję S Reichsteina oraz jej 21-acetylową pochodną.
W wyniku działania szczepu *Metarrhizium velutinum* M-6
otrzymuje się odpowiednie 11α -hydroksypochodne przy
równoczesnej hydrolizie grup acylowych do hydroksylowych
oraz enolesterów i enolestrów do grup ketonowych. Reakcja
przebiega jednokierunkowo i pozwala uzyskać produkt
z wydajnością większą niż 80%. Proces przebiega bardzo
szybko i trwa zależnie od stężenia substratu 8–14 godzin.

Pr z y k ł a d I. Pięciolitrowy szklany fermentor wypeł-

niono 2,5 l podłoża w składzie: 6,25% g ekstraktu drożdżowego 10 g hydrolizatu enzymatycznego białka krwi bydlęcej, 10 g KH_2PO_4 , 250 ml brzojki słodowej o gęstości 87° Błg i woda do 2,5 l. Po czym podłoże wysterylizowano; po sterylizacji pH podłoża wynosiło 6,0. Podłoże fermentacyjne zaszczerpiono 150 ml dwudziestotrzynastogodzinnej hodowli płynnej *Metarrhizium velutinum* M-6. Po 20 godzinach inkubacji w temperaturze 28°C (przy napowietrzaniu 1,25 l/min i mieszaniu 500 obr/min) grzybnię odsączono i zawieszono w wodzie. Do mieszaniny reakcyjnej dodano 3,750 mg pregnen-4-diol-17 α , 21-dionu-3,20 rozpuszczonego w metanolu. Inkubację kontynuowano w ciągu 12–14 godzin. W końcowym okresie transformacji postępy reakcji były kontrolowane przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej. Transformację przerwano po stwierdzeniu całkowitej przemiany pregnen-4-diol-17 α , 21-dionu-3,20. Następnie z mieszaniny pofermentacyjnej odsączono grzybnię i przemyto wodą a produkt wyekstrahowano z przesączu chloroformem. Połączone ekstrakty wysuszono bezwodnym siarczanem sodowym, przesączono i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Po jednorazowej krystalizacji z acetonu otrzymano 3100 g czystego pregnen-4-triol-11 α 17 α 21-dionu-3,20 o temperaturze topnienia 207–209°C; $[\alpha]_D^{20} = +120,4^\circ$ (1% EtOH 96%); UVA_{max} : 241 m μ (ϵ 420); IR ν_{KBr} cm $^{-1}$ 3440, 1705, 1640, 1605.

Przykład II. Do dziesięciu półlitrowych kolb dano po 100 ml podłoża o składzie: 0,25 g ekstraktu drożdżowego, 0,4 g hydrolizatu enzymatycznego białka krwi bydlęcej, 0,4 g KH_2PO_4 , 10 ml brzojki słodowej o gęstości 87° Błg i wody do 100 ml, po czym podłoże wysterylizowano. Po sterylizacji pH podłoża wynosiło 6,0. Następnie podłoże fermentacyjne zaszczerpiono 5 ml dwudziestotrzynastogodzinnej hodowli *Metarrhizium velutinum* M-6. Po 23 godzinach inkubacji w temperaturze 28°C na trzaskawce obrotowej (240 obr/min) odsączono grzybnię i zawieszono w wodzie. Do mieszaniny fermentacyjnej dodano po 150 mg 21-octanu pregnen-4-ol-17 α -dionu-3,20 rozpuszczonego w metanolu. Inkubację kontynuowano w ciągu 30 godzin, po czym mieszaninę wyekstrahowano chloroformem. Połączone ekstrakty chloroformowe wysuszono bezwodnym siarczanem sodowym, przesączono i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Po krystalizacji z acetonu otrzymano czysty pregnen-4-triol-11 α 17 α 21-dion-3,20 o temperaturze topnienia 208–211°C; $[\alpha]_D^{20} = +120,4^\circ$ (1% etanol 96%).

Przykład III. W identyczny sposób jak w przykładzie II przygotowano hodowlę *Metarrhizium velutinum* M-6. Grzybnię odsączono i zawieszono w wodzie. Do mieszaniny reakcyjnej dodano po 100 mg pregnadien-1,4-diol-17 α , 21-dionu-3,20 rozpuszczonego w metanolu. Inkubację kontynuowano przez 24 godziny, po czym mieszaninę wyekstrahowano chloroformem. Połączone ekstrakty chloroformowe wysuszono bezwodnym siarczanem sodowym, przesączono i odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Po krystalizacji z acetonu otrzymano pregnadien-1,4-triol-11 α , 17 α , 21-dion-3,20. Temperatura topnienia 221–223°C; $[\alpha]_D^{20} = +76^\circ$ (0,5% metanol).

Przykład IV. W identyczny sposób jak w przykładzie II poddano przemianie pregnen-4-ol-21-dion-3,20 do pregnen-4-diol-11 α , 21-dion-3,20 przy zastosowaniu szczepu *Metarrhizium velutinum* M-6. Suche ekstrakty były identyczne z wzorcem pregnen-4-diol-11 α , 21-dion-3,20 czyli 11 α -hydroksypochodnej dezoksykortykosteronu (porównawczo wartość Rf, reakcje barwne i rodzaj fluorescencji po wywołaniu kwasem siarkowym i kwasem fosforowym).

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania 11 α -hydroksysterydów serii pregnanu o układzie Δ^4 -3-ketonowym zawierających w położeniu 11 α atom wodoru lub grupę hydroksylową, a w położeniu 17 β ugrupowanie $-\text{COCH}_2\text{OH}$ oraz zawierających ewentualnie dodatkowe podwójne wiązanie w pozycji 1-2, przez wprowadzenie metodą mikrobiologiczną grupy wodorotlenowej w położeniu 11 α pierścienia sterydowego, znanymi tym, że związek sterydowy serii pregnanu o układzie Δ^4 -3-ketonowym zawierający w położeniu 17 α atom wodoru lub grupę hydroksylową, a w położeniu 17 β ugrupowanie $-\text{COCH}_2\text{OH}$ lub $-\text{COCH}_2\text{OAc}$, w którym Ac oznacza resztę acylową o 2-4 atomach węgla oraz zawierający ewentualnie dodatkowe podwójne wiązanie w pozycji 1-2, w postaci rozdrobnionej, roztworu lub zawiesiny, albo też jako zawarty w mieszaninie reakcyjnej produkt poprzedniej reakcji syntezy lub biosyntezy, poddaje się działaniu szczepu *Metarrhizium velutinum* M-6 w postaci hodowli, oddzielonej i zawieszanej w wodzie grzybni, przesączu hodowli lub innych preparatów enzymatycznych uzyskanych z tego szczepu, po czym surowy produkt wyodrębnia się przez ekstrakcję i ewentualnie oczyszcza w znany sposób.