



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 45228

Kl. 30 h, 2/30

VEB Serum — Werk Bernburg
Bernburg, Niemiecka Republika Demokratyczna

**Sposób wytwarzania polisacharydów o bardzo obszernym zakresie
jednostkowego ciężaru cząsteczkowego, zwłaszcza dekstranu do celów
klinicznych**

Patent trwa od dnia 20 sierpnia 1957 r.

Pierwszeństwo: 19 marca 1957 r. (Niemiecka Republika Demokratyczna).

Celem wynalazku jest wytwarzanie na drodze mikrobiologicznej syntezy polisacharydów o pożądanym ciężarze cząsteczkowym, zwłaszcza dekstranu odpowiedniego do stosowania klinicznego.

Obok ogólnie znanego znaczenia krwi konserwowanej coraz większe znaczenie uzyskują sztucznie wytworzone roztwory, których osmotyczne i fizjologiczne właściwości są takie, że w połączeniu z obecną jeszcze w organizmie cieczą ustrojową nie wywołują żadnych szkód fizjologicznych. Tego rodzaju plazma — ekspander, zwłaszcza izotoniczne roztwory poliwinylpirolidonu i dekstranu, znajdują dzisiaj często zastosowanie.

Przez działanie dekstranosukrazy na sacharozę otrzymuje się dekstran w postaci cząste-

czek o różnych wielkościach, przy czym stosunek rozdziału cząsteczkowego jest taki, że tylko nieznaczna jego część nadaje się do stosowania klinicznego.

Znane są różne sposoby, zmierzające do zwiększania wydajności tej części produktu, która nadaje się do zastosowania klinicznego, polegające na hydrolitycznej depolimeryzacji w środowisku kwaśnym lub alkalicznym albo na działaniu mechanicznym, na przykład za pomocą ultradźwięków.

Wszystkie te sposoby nie prowadzą do otrzymywania produktu klinicznego z zadowalającą wydajnością, a poza tym są trudne i kłopotliwe w przeprowadzaniu.

Próbowano usunąć te wady w ten sposób, że możliwie czystą dekstranosukrazę otrzymaną

z odpowiednich mikroorganizmów „in vitro” stosowano jako katalizator w sterowanej polimeryzacji z niskocząsteczkowym dekstranem, jako czynnikiem zapoczątkującym reakcję, co wpływa w odpowiednich warunkach na przemianę roztworu sacharozy.

Jakkolwiek w porównaniu ze starszymi sposobami pracy osiąga się zwiększenie wydajności, to jednak wytwarzanie roztworu dekstranosukrazy, nadającego się bez zastrzeżeń do stosowania, jako katalizatora w reakcji sterowanej polimeryzacji jest znacznym utrudnieniem.

Próbowano obejść technologiczne trudności wytwarzania czynnego roztworu dekstranosukrazy w ten sposób, że sterowano syntezę bezpośrednio w roztworze kultur. Wysoko cząsteczkowe dekstrany zawarte w normalnych roztworach do szczepienia, zawierających sacharozę, utrudniają jednak działanie sztucznie wprowadzonego czynnika zapoczątkowującego reakcję tak wybitnie, że tylko pewna część wytworzonego dekstranu posiada ciężar cząsteczkowy w pożądanym zakresie.

W sposobie według wynalazku unika się wszystkich wymienionych dotychczas trudności i umożliwia osiągnięcie wysokich wydajności dekstranu, nadającego się do celów klinicznych, a to na skutek tego, że dla szczepów *Leuconostoc mesenteroides* i *Leuconostoc dekstraneus*, jako źródło węgla stosuje się w roztworach kultur substancje organiczne, które gwarantują bakteriom wysoką żywotność i optymalną zdolność tworzenia dekstranu, a same nie są czynnikiem zapoczątkującym syntezę dekstranu i nie wytwarzają pod wpływem układu enzymatycznego czynnika zapoczątkowującego reakcję.

Substancje takie nie działają trująco na bakterie. Bakterie nawet po wielokrotnym przejściu przez tego rodzaju podłoże w postaci roztworów pożywek zatrzymują zdolność tworzenia enzymu dekstranosukrazy.

Jako tego rodzaju źródła węgla nadają się szczególnie te substancje organiczne, które są zbliżone do produktów przemiany danego szczepu bakterii, a więc kwasy organiczne, rozpuszczalne w wodzie, a przede wszystkim kwasy grupy kwasu cytrynowego, niższe kwasy tłuszczowe i kwasy dwu- względnie trójkarboksylowe oraz niższe alkohole, jak etanol, propanol i butanol.

Jako źródła węgla, które nie mogą znajdować się w roztworze do szczepienia, należy rozumieć także substancje, które albo same

przez się mogą działać jako czynnik zapoczątkowujący reakcję, a zwłaszcza cukry rzędu maltozy i izmaltozy i takie, które pod wpływem układu enzymatycznego mogą tworzyć związki, działające inicjująco, zwłaszcza jak sacharoza.

Cukry o małym działaniu zapoczątkowującym reakcję, jak glukoza, a zwłaszcza fruktoza, mogą znacznie podnieść żywotność szczepu bakterii.

Ażeby uniknąć ujemnego wpływu cukrów, znajdujących się w roztworze do szczepienia, na syntezę dekstranu, stosuje się niskie stężenie cukrów (nie większe od 0,5%).

Ażeby roztwór do szczepienia był rzeczywiście wolny od substancji o bezpośrednich lub pośrednich właściwościach zapoczątkowywania reakcji należy przeprowadzić parolub kilkakrotne przeszczepienia kultur na pożywkę z powyżej podanych źródeł węgla.

W ten sposób otrzymany roztwór do szczepienia spełnia trzy istotne warunki: jest wolny od czynnika zapoczątkowującego reakcję i umożliwia żywotne rozmnażanie bakterii przy niezmnieszonej zdolności wytwarzania dekstranu.

Jeśli przeszczepić taki roztwór do szczepienia na przygotowany w zwykły sposób roztwór przeznaczony do syntezy, do którego dodano uprzednio obliczoną ilość starteru, to znaczący czynnik zapoczątkowujący reakcję, wówczas osiąga się sterowaną syntezę dekstranu, przebiegającą bez zakłóceń, która niespodziewanie okazała się znacznie lepsza od kierowanej enzymatycznej syntezy pod względem zwiększenia wydajności pożądanego produktu. Przy tym sposób jest nie skomplikowany i umożliwia jego technologiczne wykorzystanie za pomocą prostych środków.

W stosunku do znanego sposobu hydrolitycznego otrzymywania dekstranu klinicznego sposób sterowanej syntezy według wynalazku stanowi znaczny postęp. Odpada nie dający się sterować, a tym samym deficytowy przebieg hydrolizy, jak również kosztowne, wielokrotne frakcjonowanie. Otrzymany sposobem według wynalazku dekstran już po fermentacji posiada ciężar cząsteczkowy w pożądanym zakresie o ustalonej wydajności dekstranu klinicznego. W stosunku do sposobu otrzymywania klinicznego dekstranu za pomocą roztworu enzymatycznego w wysokim stopniu oczyszczonego i zateżonego według zasad sterowanej syntezy,

sposób według wynalazku daje tę korzyść, że sterowanie prowadzi się bezpośrednio w roztworze kultur bez technologicznie kosztownych środków, jak na przykład oddzielanie i zą-
żanie układu enzymatycznego.

Według J. A. Wolff'a i jego współpracowni-
ków Ind. Eng. Chem. 46, S. 2605(1954) wydaj-
ność dekstranu klinicznego otrzymanego spo-
sobem hydrolitycznym, wynosi od 14—30%
produktu wyjściowego. W sposobie według wy-
nalazku wydajność wynosi 60—70%. Sterowanie
syntezy jest powtarzane. W poniżej umieszczo-
nej tabeli podano wyniki z 20 kolejnych syn-
tez. Odchylenia nie mają znaczenia i mieszczą
się w większej części w granicach błędu
w oznaczeniach ciężaru cząsteczkowego, za po-
mocą pomiaru lepkości.

Ciężar cząsteczkowy nie uległ zmianie po
przeprowadzonym frakcjonowaniu.

Tablice	Ładunek	Ciężar cząsteczkowy
	91	65 000
	92	76 000
	93	72 000
	94	74 000
	95	78 000
	96	77 000
	97	76 000
	98	75 000
	99	81 000
	100	77 000
	101	75 000
	102	78 000
	103	81 000
	104	78 000
	105	80 000
	106	75 000
	107	77 000
	108	76 000
	109	63 000
	110	75 000

Przykład I. Śluz z podłoża pożywki aga-
rowej (3% sacharozy, 0,5% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$,
0,1% KCl, 0,1% peptonu, 1% autolizatu dro-
żdży, 3% agaru, woda destylowana do 100,
pH = 7,0 (nastawione za pomocą KOH) poro-
śniętej szczepem *Leuconostoc mesenteroides*
wprowadza się na roztwór pożywki I, o na-
stępującym składzie:

1,0% kwasu cytrynowego
0,5% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
0,1% KCl
0,1% peptonu
1,0% autolizatu drożdży
pH = 7

uzupełnionej wodą destylowaną do 100.

Po osiągnięciu maksymalnego zmętnienia za-
szczepia się tym roztworem kultury w stosun-
ku 1:10 roztwór pożywki I.

Po osiągnięciu ponownie maksymalnego zmę-
tnienia zaszczepia się tym roztworem w sto-
sunku 1:10 roztwór pożywki I. Roztwór ten
po osiągnięciu maksymalnego zmętnienia sta-
nowi roztwór kultury przeznaczony do szczep-
ienia, wolny już od dekstranu i cukrów.

Roztworem kultury zaszczepia się w stosunku
1:10 roztwór przeznaczony do syntezy o na-
stępującym składzie:

10% sacharozy
2% starter-dekstran, ciężar cząsteczko-
wy 20.000
sole i białka, jak w roztworze po-
żywki I
pH = 7

uzupełnione wodą destylowaną do 100.

Po obniżeniu się wartości pH do 3,9 synteza
jest zakończona. Dekstran przerabia się dalej
według znanych metod. Wydajność: 85%, prze-
ciężny ciężar cząsteczkowy: 60.000.

Przykład II. Śluz pochodzący ze szczepu
Leuconostoc dextranicus wprowadza się na po-
żywkę wylaną na dno kolby (kolba o płaskim
dnie), o składzie następującym:

3% agaru
0,5% fruktozy
sole i białka, jak w roztworze po-
żywki I.

Po silnym rozwoju kolonii napienia się kol-
bę roztworem pożywki, o następującym skła-
dzie:

0,5% propanolu
sole i białka, jak w roztworze po-
żywki I
pH = 7

i uzupełnia wodą destylowaną do 100.

Po otrzymaniu maksymalnego zmętnienia za-
szczepia się tym roztworem kultury w stosunku
1:10 roztwór pożywki o następującym skła-
dzie:

1,5% kwasu propionowego

sole i dodatek białka, jak w pożywce I

pH = 7

i uzupełnia wodą do 100.

Po osiągnięciu maksymalnego zmętnienia, roztwór kultury stanowi roztwór do szczepienia roztworu przeznaczanego do syntezy, który może mieć skład podobny do podanego w przykładzie I i po zakończeniu syntezy dekstranowej zostaje przerobiony w zwykły sposób.

Wymienione tutaj źródła węgla (kwas cytrynowy, fruktoza, propanol, kwas propionowy) można zastąpić innymi, takimi jak etanol, kwas octowy, winowy i mlekowy. Liczba przeszczepiań roztworów kultur na roztwory pożywek zawierających źródło węgla bez czynnika inicjującego, lub z nieznacznym udziałem tego czynnika może wynosić od 2 do 6. Liczba ta zależy od osiągniętego przez przeszczepiania stopnia oczyszczenia z dekstranu i cukru. Ze względu na nieznaczące działanie inicjujące iruktozy nie należy jej stosować, jako źródło węgla przy końcowych przeszczepieniach.

Sterowanie syntezy następuje według przebiegu zjawisk według określonych praw kinetyki polimeryzacji. Ciężar cząsteczkowy i liczba cząsteczek zapoczątkowujących reakcję, jak również liczba cząsteczek sacharozy dają ciężar cząsteczkowy otrzymywanego dekstranu, przy czym należy uwzględnić przy syntezie dekstranu wydajność czyli efektywnie prze-reagowany glikozyl sacharozy. Kiedy sterowanie ma dać w wyniku ciężar cząsteczkowy 40.000, to roztwór przeznaczony do syntezy może zawierać obok soli i białka 20% sacharozy, 2,5% dekstranu o ciężarze cząsteczkowym 10.000, jako starter. Wydajność fermentacji wynosi przeciętnie 80%, teorii (ciężar cząsteczkowy — 40.000). Przy sterowaniu mającym doprowadzić do ciężaru cząsteczkowego — 75.000, roztwór przeznaczony do syntezy może zawierać 10% sacharozy i 2% dekstranu, o ciężarze cząsteczkowym 25.000 (jako starter). Wydajność fermentacji wynosi przeciętnie 90% (ciężar cząsteczkowy 75.000).

Przy sterowaniu mającym doprowadzić do ciężaru cząsteczkowego — 300.000 roztwór

przeznaczony do syntezy może zawierać 10% sacharozy i 1,3% dekstranu, o ciężarze cząsteczkowym 75.000 (jako starter). Wydajność fermentacji wynosi przeciętnie 75% (ciężar cząsteczkowy 300.000).

Do wytworzenia dekstranu o maksymalnym stopniu polimeryzacji nadaje się również sposób zaszczepiania roztworem do szczepienia bez środka inicjującego reakcję, ponieważ w przypadku tym z braku niskocząsteczkowego czynnika zapoczątkowującego reakcję (zwłaszcza cukru) mogą się rozwinąć tylko wysokocząsteczkowe składniki.

Kiedy sterowanie ma doprowadzić do możliwie największego ciężaru cząsteczkowego, to roztwór przeznaczony do syntezy zawiera jedynie sacharozę, możliwie poniżej 10%, około 7,5%. Wydajność fermentacji wynosi przeciętnie 90% wysokocząsteczkowego dekstranu.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób wytwarzania polisacharydów o bardzo obszernym zakresie jednostkowego ciężaru cząsteczkowego, szczególnie dekstranu do celów klinicznych, na drodze sterowanej biologicznej syntezy, zwłaszcza za pomocą aktywnych szczepów *Leuconostoc mesenteroides*, znamienny tym, że do biologicznej syntezy polisacharydu stosuje się roztwory kultur do szczepienia, które wprowadza się na pożywkę używaną do otrzymywania dekstranu, zawierającą jako źródło węgla tylko takie związki organiczne, jak kwasy organiczne rozpuszczalne w wodzie, zwłaszcza niższe kwasy tłuszczowe i kwasy dwu- względnie trójkarboksylowe albo niskocząsteczkowe alkohole, które gwarantują wysoką żywotność bakterii i optymalną zdolność tworzenia dekstranu, po czym tę kulturę do szczepienia przeszczepia się na zwykłą pożywkę, zawierającą sacharozę z dodatkiem lub bez dodatku czynnika zapoczątkowującego reakcję (startera) i roztwór przerabia w znany sposób.

VEB Serum — Werk Bernburg

Zastępca: inż. Józef Felkner,
rzecznik patentowy

