

POLSKA  
RZECZPOSPOLITA  
LUDOWA



URZĄD  
PATENTOWY  
PRL

# OPIS PATENTOWY

68 243

Patent dodatkowy  
do patentu \_\_\_\_\_

Kl. 12p,4/01

Zgłoszono: 16.XII.1969 (P 137 592)

Pierwszeństwo: \_\_\_\_\_

MKP C07d 99/14

Opublikowano: 20.VIII.1973

UKD

Współtwórcy wynalazku: Tadeusz Szczesiak, Leonard Karabin,  
Hanna Krakowiak-Niemczyk, Krystyna Wituch

Właściciel patentu: Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne "Pofa",  
Warszawa (Polska)

## Sposób wytwarzania kwasu 6-aminopenicylanowego

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kwasu 6-aminopenicylanowego z penicyliny benzylowej (penicyliny G) przez rozszczepianie wodnego roztworu penicyliny benzylowej lub jej soli za pomocą enzymów zawartych w masie komórkowej *Thiobacillus trautweinii*.

Dotychczas do wytwarzania kwasu 6-aminopenicylanowego stosowano różne mikroorganizmy posiadające enzym lub zespół enzymów rozszczepiających penicyliny.

S. Murao (Journ. Agric. Chem. Soc. Japan, 29, 400-407, 1955) stosował do wytwarzania kwasu 6-aminopenicylanowego amidazę penicylinową - enzym otrzymany z *Penicillium chrysogenum* Q 176 po uprzednim działaniu na ten grzyb sulfatiazolem. Amidaza penicylinowa odszczepiała kwas fenylooctowy od cząsteczki penicyliny G. Sposób ten był trudny do przeprowadzenia i nie zapewniał otrzymania dostatecznie dużych ilości kwasu 6-aminopenicylanowego.

W belgijskim opisie patentowym nr 569728 podano sposób, polegający na hodowli *Penicillium chrysogenum* w konwencjonalnych warunkach, lecz na pożywce, nie zawierającej prekursorów penicyliny takich, jak kwas fenylooctowy lub kwas fenoksyoctowy. Sposobem tym otrzymywano bardzo małe stężenie kwasu 6-aminopenicylanowego, w konsekwencji czego izolacja kwasu była utrudniona i sposób ten okazał się nieprzystatny do zastosowania w skali przemysłowej.

W opisach patentowych St. Zjedn. Am. nr nr 3014846, 3121667, 3144395, 3150059, 3260653, 3239428, 3272715, 3297546 wykazano postęp w sposobach wytwarzania kwasu 6-aminopenicylanowego stosując inne gatunki mikroorganizmów, posiadające enzymy rozszczepiające penicyliny. Jednakże sposoby wytwarzania kwasu 6-aminopenicylanowego

2

przedstawione w wyżej wymienionych opisach patentowych posiadają wady. Mianowicie, albo przebieg całego procesu (proces namnażania masy komórkowej i proces rozszczepiania) jest długotrwały, albo skład stosowanych pożywek jest skomplikowany, lub sposoby te posiadają wymienione wady łącznie.

Ponadto, stosowane w tych sposobach mikroorganizmy tworzą podczas hodowli zawiesinę komórkową trudną do oddzielenia od płynu hodowlanego, co wymaga użycia szybkoobrotowych wirówek (15000-20000 obr/min) w celu uzyskania masy komórkowej. Natomiast wytrącenie komórek za pomocą związków powierzchniowo czynnych, jak to przedstawiono w opisie patentowym Stanów Zjednoczonych Am. nr 3278391, wpływa na zmniejszenie zdolności masy komórkowej do rozszczepiania penicylin już w pierwszym procesie rozszczepiania, w następstwie czego ponowne użycie tej samej masy komórkowej do rozszczepiania penicyliny nie jest optymalne.

Sposób według wynalazku polega na tym, że wodny roztwór penicyliny benzylowej lub jej soli w środowisku o wartości pH = 6,0-9,5 rozszczepia się w temperaturze 15-45°C za pomocą enzymów zawartych w masie komórkowej *Thiobacillus trautweinii* pasażowanego uprzednio przez pożywkę zawierającą przyswajalne źródło węgla i azotu, następnie w znany sposób oddziela masę komórkową od roztworu zawierającego kwas 6-aminopenicylanowy, który ekstrahuje się metodami konwencjonalnymi.

Bakterie *Thiobacillus trautweinii* pasażuje się kolejno przez pożywkę półpłynną, pożywkę stałą i pożywkę płynną.

Bakterie *Thiobacillus trautweinii* hoduje się na pożywkach zawierających jako jedyne źródło węgla i azotu substancje białkowe.

Bakterie *Thiobacillus trautweinii* hoduje się w temperaturze 10–40°C na pożywkach o wartości pH = 3,0–10,0 w ciągu 6–36 godzin.

Masę komórkową *Thiobacillus trautweinii* stosuje się w ilości 20 g na 400–2000 mg penicyliny benzylowej.

Wartość pH podczas rozszczepiania penicyliny benzylowej koryguje się za pomocą zasad nieorganicznych, korzystnie KOH lub NaOH. Proces rozszczepiania penicyliny benzylowej prowadzi się w ciągu 15 minut do 4 godzin.

W sposobie według wynalazku, zarówno proces namnażania masy komórkowej, jak i proces rozszczepiania są krótkotrwałe, a w skład stosowanych pożywek wchodzi łatwo dostępne surowce oraz odczynniki. Ponadto w sposobie według wynalazku stosuje się drobnoustrój *Thiobacillus trautweinii*, który w płynie hodowlanym tworzy zawieszinę komórkową, mającą tendencję do szybkiej sedimentacji i przez to oddzielanie masy komórkowej jest procesem łatwym niewymagającym użycia szybkoobrotowych wirówek. Dodatkową zaletą sposobu według wynalazku jest, że tę samą masę komórkową można stosować kilkakrotnie. W następstwie powyższego wytwarzanie kwasu 6-aminopenicylanowego sposobem według wynalazku jest procesem łatwym i tanim.

Sposobem według wynalazku otrzymuje się stosunkowo duże stężenie kwasu 6-aminopenicylanowego w płynie po rozszczepieniu dzięki zwiększonej zdolności masy komórkowej do rozszczepiania penicyliny po uprzednio przeprowadzonych pasażach, polegających na hodowli *Thiobacillus trautweinii* na pożywce półpłynnej i pożywce stałej oraz w pożywce płynnej o właściwym składzie i w odpowiednich warunkach, a także dzięki właściwie dobranym warunkom podczas przebiegu rozszczepiania penicyliny.

Zastosowanie pożywki półpłynnej w pierwszym etapie pasażowania pozwala na długotrwałe przechowywanie *Thiobacillus trautweinii* bez utraty jego zdolności zarówno do wzrostu, jak i do rozszczepiania penicyliny, dając odpowiedni materiał szczepienny dla pożywki stałej.

Zastosowanie pożywki stałej w drugim etapie pasażowania zwiększa zdolność *Thiobacillus trautweinii* do rozszczepiania penicyliny w następstwie fizjologicznej indukcji enzymów rozszczepiających penicylinę, dając odpowiedni materiał szczepienny dla pożywki płynnej.

Zastosowanie pożywki płynnej w trzecim etapie pasażowania umożliwia namnożenie masy komórkowej *Thiobacillus trautweinii* o dużej zdolności do rozszczepiania penicyliny.

Stosowane pożywki nie zawierają węglowodanów, które wpływają ujemnie na zdolność szczepu do wytwarzania enzymów rozszczepiających penicylinę, co stanowi dodatkową zaletę sposobu według wynalazku.

Zastosowanie masy komórkowej *Thiobacillus trautweinii* w ilości 20 g masy komórkowej na 400–2000 mg penicyliny benzylowej, użytej do rozszczepiania oraz przeprowadzenie procesu rozszczepiania we właściwych warunkach pH i temperatury pozwala na otrzymanie w płynie dość dużego stężenia kwasu 6-aminopenicylanowego podczas stosunkowo krótkotrwałego procesu.

Wytwarzanie kwasu 6-aminopenicylanowego sposobem według wynalazku przedstawiają szczegółowe przykłady, w których procenty oznaczają procenty objętościowe, o ile nie zaznaczono inaczej.

Przygotowywano pożywkę półpłynną o składzie:

|                      |                 |
|----------------------|-----------------|
| Wyciąg Hottinger'a*) | 40,0%           |
| Agar                 | 0,2% (wagowych) |
| Woda destylowana     | do 100,0%       |

\*Jest to wodny wyciąg z mięsa wołowego trawionego enzymami trzustki, zawierający około 600 mg azotu aminowego na 100 ml wyciągu.

Wartość pH pożywki nastawiono na 7,2 za pomocą wodorotlenku sodowego. Tak przygotowaną pożywkę rozlewano na gorąco po 10 ml do probówek i wyjąławiano w temperaturze 110°C w ciągu 30 minut. Probówki z pożywką szczepiono 24 godziną hodowlą bakterii pobraną oczkiem z takiej samej pożywki. Inkubację przeprowadzono w temperaturze 28°C w ciągu 24 godzin.

Przygotowywano pożywkę stałą o składzie:

|                                             |                 |
|---------------------------------------------|-----------------|
| Wyciąg namokowy kukurydzy (50% suchej masy) | 8,0%            |
| Agar                                        | 2,0% (wagowych) |
| Woda wodociągowa                            | do 100,0%       |

Wartość pH pożywki nastawiono na 7,2 za pomocą wodorotlenku sodowego. Tak przygotowaną pożywkę rozlewano na gorąco po 10 ml do probówek i wyjąławiano w temperaturze 110°C w ciągu 30 minut. Probówki z pożywką szczepiono 24 godziną hodowlą bakterii pobraną oczkiem z pożywki półpłynnej. Inkubację przeprowadzono w temperaturze 28°C w ciągu 24 godzin.

Przygotowywano pożywkę płynną o składzie:

|                                                         |                |
|---------------------------------------------------------|----------------|
| Preparowany wyciąg namokowy kukurydzy (10% suchej masy) | 15,0%          |
| Pepton "Bacutil"                                        | 0,25% wagowych |
| Chlorek sodowy techniczny                               | 0,25% wagowych |
| Woda wodociągowa                                        | do 100,0%      |

Wartość pH pożywki nastawiono na 7,2 za pomocą wodorotlenku sodowego. Tak przygotowaną pożywkę rozlewano po 50 ml do kolb Erlenmeyer'a o pojemności 500 ml i wyjąławiano w temperaturze 110°C w ciągu 30 minut. Każdą kolbę z pożywką szczepiono 0,25 ml zawiesiny bakterii z pożywki stałej. Hodowlę prowadzono na trzęsawce obrotowej o 220 obrotach/minutę i mimośrodzie 25 mm w temperaturze 28°C w ciągu 18 godzin. Po zakończeniu hodowli uzyskaną zawieszinę komórkową w pożywce płynnej poddano wirowaniu na wirówce o 3000 obrotach/minutę. Płyn nad osadu usunięto przez dekantację.

Do kolby o pojemności 500 ml wlewano 300 ml wody destylowanej i dodawano masę komórkową otrzymaną z pożywki płynnej o objętości 3000 ml (20 g masy komórkowej w postaci ciasta) oraz dodawano 1,2 ml toluenu. Kolbę z zawartością umieszczono w łaźni wodnej z termoregulacją o temperaturze 35°C i wprowadzono do kolby mieszałkę. Mieszano aż do otrzymania jednorodnej zawiesiny komórek w płynie. Następnie dodawano w trakcie mieszania 400 mg soli sodowej penicyliny G co odpowiadało 2000 j/ml.

Rozszczepianie przeprowadzono w środowisku o wartości pH = 8,0.

W celu utrzymania pH o wymaganej wartości dodawano 6n NaOH lub 6n KOH. Rozszczepianie przeprowadzono w ciągu 2 godzin. Obecność kwasu 6-aminopenicylanowego

wytwarzanego podczas rozszczepiania potwierdzano metodą chromatografii na talku w układzie butanol : aceton : eter : woda - (72 : 22,5 : 22,5 : 8,5) według Wasilewa B., Cieślaka J.: Cienkowarstwowa chromatografia kwasu 6-aminopenicylanowego i penicyliny na talku. *Antibiotyki*, 10, 877, 1965. Po zakończonej reakcji oddzielano masę komórkową przez wirowanie a otrzymany płyn zakwaszono 6n HCL do wartości pH = 2,0 i poddawano 3-krotnej ekstrakcji octanem amylu. Nierozszczepiona penicylina i odszczepiony kwas feniloctowy przechodziły do fazy organicznej. Kwas 6-aminopenicylanowy pozostały w fazie wodnej oznaczano ilościowo konwencjonalną metodą biologiczną po uprzednim przeprowadzeniu go w penicylinę benzylową za pomocą chlorku kwasu feniloctowego. Jako organizm testowy stosowano *Bacillus subtilis* 6633.

Wyniki oznaczeń wyrażone w jednostkach penicyliny benzylowej, przy czym jednostka penicyliny benzylowej (soli sodowej) odpowiada 0,658 jednostki kwasu 6-aminopenicylanowego. Stężenie penicyliny w płynie przygotowanym do procesu rozszczepiania wynosiło 2000 j/ml. Stężenie kwasu 6-aminopenicylanowego po zakończeniu rozszczepiania wynosiło 355,3 j/ml.

Kwas 6-aminopenicylanowy, znajdujący się w płynach po rozszczepianiu, izolowano jedną z konwencjonalnych metod.

**Przykład II.** Skład jakościowy i ilościowy pożywek, sposób ich przygotowania, warunki hodowli *Thiobacillus trautweinii* oraz sposób uzyskiwania masy komórkowej były takie same jak w przykładzie I. Ilość masy komórkowej użytej do rozszczepiania penicyliny i warunki rozszczepiania były takie same jak w przykładzie I, lecz ilość użytej penicyliny wynosiła 2000 mg w 300 ml płynu, co odpowiadało 10000 j/ml. Metody oznaczania kwasu 6-aminopenicylanowego były takie same jak w przykładzie I.

Stężenie penicyliny w płynie przygotowanym do rozszczepiania wynosiło 10000 j/ml. Stężenie kwasu 6-aminopenicylanowego po zakończeniu rozszczepiania wynosiło 1645 j/ml.

**Przykład III.** Skład jakościowy i ilościowy pożywki półpłynnej i stałej oraz sposób ich przygotowywania był taki sam jak w przykładzie I. Natomiast ze składu pożywki płynnej wyeliminowano pepton, w następstwie czego skład pożywki był następujący:

|                                                         |                |
|---------------------------------------------------------|----------------|
| Preparowany wyciąg namokowy kukurydzy (10% suchej masy) | 15,0%          |
| Chlorek sodowy techniczny                               | 0,25% wagowych |
| Woda wodociągowa                                        | do 100,0%      |

Sposób przygotowania pożywki płynnej, warunki hodowli *Thiobacillus trautweinii* oraz sposób uzyskania masy

komórkowej były takie same jak w przykładzie I. Ilość masy komórkowej użytej do rozszczepiania i warunki rozszczepiania były takie same, jak w przykładzie I, lecz ilość użytej penicyliny wynosiła 2000 mg, co odpowiadało 10000 j/ml. Metody oznaczania kwasu 6-aminopenicylanowego były takie same jak w przykładzie I.

Stężenie penicyliny w płynie przygotowanym do rozszczepiania wynosiło 10000 j/ml. Stężenie kwasu 6-aminopenicylanowego po zakończeniu rozszczepiania wynosiło 1414,7 j/ml.

#### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania kwasu 6-aminopenicylanowego na drodze enzymatycznego rozszczepiania penicyliny benzylowej, znamienny tym, że wodny roztwór penicyliny benzylowej lub jej soli w środowisku o wartości pH = 6,0–9,5 rozszczepia się w temperaturze 15–45°C za pomocą enzymów zawartych w masie komórkowej *Thiobacillus trautweinii* pasażowanego uprzednio przez pożywkę zawierającą przyswajalne źródło węgla i azotu, następnie w znany sposób oddziela masę komórkową od roztworu zawierającego kwas 6-aminopenicylanowy, który ekstrahuje się metodami konwencjonalnymi.
2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że bakterie *Thiobacillus trautweinii* pasażuje się kolejno przez pożywkę półpłynną, pożywkę stałą i pożywkę płynną.
3. Sposób według zastrz. 1, 2, znamienny tym, że bakterie *Thiobacillus trautweinii* hoduje się na pożywkach zawierających jako jedyne źródło węgla i azotu substancje białkowe.
4. Sposób według zastrz. 1–3, znamienny tym, że do hodowli *Thiobacillus trautweinii* stosuje się pożywkę o wartości pH = 3,0–10,0.
5. Sposób według zastrz. 1–3, znamienny tym, że *Thiobacillus trautweinii* hoduje się w temperaturze 10–40°C.
6. Sposób według zastrz. 1–4, znamienny tym, że *Thiobacillus trautweinii* hoduje się w ciągu 6–36 godzin.
7. Sposób według zastrz. 1–6, znamienny tym, że masę komórkową *Thiobacillus trautweinii* stosuje się w ilości 20 g na 400–2000 mg penicyliny benzylowej.
8. Sposób według zastrz. 1–7, znamienny tym, że wartość pH podczas rozszczepiania penicyliny benzylowej koryguje się za pomocą nieorganicznych zasad, korzystnie KOH lub NaOH.
9. Sposób według zastrz. 1–8, znamienny tym, że proces rozszczepiania penicyliny benzylowej prowadzi się w ciągu od 15 minut do 4 godzin.