



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

200 022
(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlásené 07 07 78
(21) PV 3690-78

(51) Int. Cl. C 07 D 501/12

(40) Zverejnené 30 11 79
(45) Vydané 01 02 83

(75)

Autor vynálezu PRIMM RICHARD doc. ing. CSc., BRATISLAVA
LUCINOVÁ EVA ing., BANSKÁ BYSTRICA a
WEIWARD LADISLAV ing. CSc., BANSKÁ BYSTRICA

(54)

Spôsob izolácie cefalosporínu C z fermentačnej pôdy

1

Vynález sa týka spôsobu izolácie cefalosporínu C z fermentačnej pôdy pri súčasnom znížení obsahu nežiadúcich nečistôt v izolovanom produkte.

Izolácia a čistenie cefalosporínu C naväzuje na jeho prípravu fermentačnou cestou. Je známe, že keď fermentujeme živné médium určitými mikroorganizmami napríklad kmeňom *Cephalosporium acremonium* ATCC 14553 obsahuje médium biologicky aktívnu látku /Craeford K. a kol.: Antibiotic production by a species of *Cephalosporium*. J. Gen. Microbiol. 6 /1952/, str. 47 - 59; Newton G. G. F., Abraham E. P.: *Cephalosporium* C a new antibiotic containing sulphur and O-amino adipic acid. Nature 175 /1955/, str. 548; Hewitt W. L.: The cephalosporins. The Journal of Infectious Diseases 128 /1973/, str. 312. Tieto fermentačné postupy sú uvedené tiež vo švajčiarskych patentoch 565246, 570459, 570460, v NSR pat. č. 1 492 053, 2 239 321, USA pat. č. 3 082 155, v brit. pat. č. 820 422. Tieto patenty obsahujú tiež postupy získavania a čistenia cefalosporínu C zo surovej fermentačnej pôdy, zahŕňujúce tieto následné operácie: acidifikácia, filtrácia, dekolorizácia, odstránenie anorganických iónov, adsorpciu antibiotika a elúciu. Podľa iných izolačných postupov napr. US pat. č. 3 739 002, 3 931 161, 3 835 129, NSR pat. č. 2 157 693, 2 255 973, pat. ZSSR č. 282 174 sa cefalosporín C z fermentačnej pôdy získava vo forme rôznych N-halogenalkanoyl či N-benzoyl derivátov, ktoré sa ďalej prevedú na soli.

Významnou skupinou izolačných postupov sú postupy založené na princípe delenia základných a acidických látok pomocou syntetických ionexov. Tieto izolačné postupy s rôznymi

200 022

úpravami fermentačnej pôdy, obmenami použitých ionexov a kombinácií ionexov rôzneho stupňa bázičnosti, resp. acidity popisuje napríklad franc. pat. č. 1 210 823, USA-pat. č. 3 467 654, pat. NSR č. 1 125 564 a 1 617 456 a švéd. pat. č. 215 561.

Hydrofilné antibiotiká, medzi ktoré patrí tiež cefalosporín C sa môžu zo zložitých zmesí napr. zo surovej fermentačnej pôdy obsahujúcej veľké množstvo organických a anorganických zlúčenín, získať pomocou makroporéznych neionogénnych sorbentov typu Amberlite XAD-2, resp. XAD-4, Diaion HP-20, resp. Ostion SP-1, resp. SP-2.

Izolácia týmito spôsobmi je uvedená napr. v US pat. č. 3 725 400, švéd. pat. č. 541 579 a v pat. ZSSR č. 350 265. Podľa uvedených spôsobov sa antibiotikum získané pomocou neionogénnych sorbentov ďalej purifikuje na slabo bázičných anexoch /napr. typu Amberlite IRA-68, IR-4B, IR-45, XB-265 alebo IMAC A 13T a A 17 P/. Z takto prečisteného filtrátu sa môže po jeho prípadnom zahutnení izolovať cefalosporín C buď vo forme voľnej kyseliny, alebo vo forme solí s alkalickými kovmi, resp. kovmi alkalických zemín, amónnych solí, či solí s organickými bázami, alebo tiež vo forme ťažkorozpustných komplexov s ťažkými kovmi ako sú Cu, Hg, Mn a hlavne Zn. Kvalita Zn komplexu a rýchlosť jeho zrážania sú vo veľkej miere závislé od obsahu znečistenín, hlavne rozkladných tiebutánových kyselín, vznikajúcich v priebehu biosyntézy cefalosporínu C z metionínu /F. Benz aj.: Metionine Metabolism and CFS-C Synthesis in Cephalosporium acremonium. Eur. J. Biochem. 20 /1971/, str. 81-88; J. Nüesch H. J. Treichler: Genet. Ind. Macroorg., Prague, 1973, str. 324-325/.

Purifikácia cefalosporínu C si doteraz vyžadovala dvojstupňový postup, pozostávajúci z čistenia na neionogénnych živiciach a následnom čistení na anexe.

Túto zložitú doterajšiu izoláciu postupov odstraňuje predložený vynález, ktorého predmetom je spôsob izolácie cefalosporínu C z fermentačnej pôdy upravenej močovinou, spracovaním filtrátu okyslenej fermentačnej pôdy neionogénnymi sorbentami, desorpciou vodným roztokom n-butanolu alebo acetátovým tlmivým roztokom a vyzrážaním cefalosporínu C z eluátov do formy voľnej kyseliny, nerozpustných solí, alebo zrážaním v podobe ťažko rozpustných komplexov.

Týmto sa celý postup zjednodušuje na jedноступňovú purifikáciu na živiciach bez dočistenia na anexe.

Cefalosporín C sa sorbuje na živicu z roztoku - obvykle z filtrátu fermentačnej pôdy - kde je prítomné aj veľké množstvo látok podobných tomuto antibiotiku z hľadiska fyzikálnej a chemickej povahy. Cefalosporín C sa adsorbuje kvantitatívne, neadsorbuje sa však väčšia časť nečistôt, ktoré prešli ešte do filtrátu zo surovej fermentačnej pôdy.

Antibiotikum naadsorbované na sorbente sa z neho desorbuje 3 až 6,5% vodným roztokom n-butanolu, alebo 0,05 až 1 M vodnými roztokmi acetátového tlmivého roztoku o pH 4,0 až 7,0.

Vhodná pracovná oblasť pH neionogénnych sorbentov je 1 až 8 s výhodou 2 až 3. Na túto hodnotu sa surová fermentačná pôda, predom upravená s 5 až 10 mg/ml močoviny, obsahujúca cefalosporín C môže upraviť buď katexami v H^+ forme, alebo rôznymi kyselinami, najčastejšie kyselinou sírovou, chlorovodíkovou, fosforečnou, šťavelovou. Ako neionogénne sorbenty pre izoláciu cefalosporínu C dobre použiteľné sú syntetické živice o veľkosti pórov 4 až 20 nm, mernom povrehu 100-1000 m²/g a veľkosti častíc 0,3 až 1 mm. Sú to napríklad sorben-

ty typu Ostion SP-1 a SP-2, Amberlite XAD-2 a XAD-4, Diaion HP-20, ktoré sú kopolymérmi styrénu s divinylbenzénom. Sorbenty sa regenerujú vodnými alebo vodno-acetónovými alkalickými roztokmi napr. 25% vodným roztokom acetónu, obsahujúcim 2 % NaOH. Výhodná je tiež regenerácia vodným roztokom NaOH s následným premývaním živice acetónom. Na regeneráciu sa môže tiež použiť vodný roztok alkalického chlornanu a zbytok oxidovadla odstrániť vhodným redukčným činidlom.

Z takto získaných eluátov obsahujúcich rozpustený cefalosporín C sa vyzráža cefalosporín C vo forme nerozpustných solí alebo komplexov z ťažkými kovmi.

Prednosťou postupu izolácie cefalosporínu C podľa predloženého vynálezu je zjednodušené získanie antibiotika spôsobom zaisťujúcim súčasne získanie produktu z dostatočnou čistotou potrebnou napr. pre chemickú konverziu na 7-aminocefalosporínovú kyselinu. Predmet vynálezu je ďalej podložený príkladmi, ktoré však rozsah vynálezu neobmedzujú.

Príklad 1

K surovej fermentačnej pôde sa pridá 10 mg/ml močoviny a hodnota pH sa upraví s kyselinou sírovou zriedenou s vodou v pomere 1:4 na pH 2,6. Biomasa a ďalšie zložky sa oddelia a získa sa číry roztok z obsahom 3000 $\mu\text{g/ml}$ cefalosporínu C. 5000 ml tohoto filtrátu sa podrobí perkolácii cez 4000 ml Ostionu SP-1 pri mernom zaťažení 1 hodina⁻¹. Zbytok adsorbátu sa odstráni dvomi litrami vody. Zo sorbentu sa cefalosporín C eluuje 6,2% vodným roztokom n-butanolu. Získa sa 2540 ml hlavných eluátových frakcií obsahujúcich 4300 μg cefalosporínu C v 1 ml eluátu. K takto získanému eluátu sa za chladenia a miešania pridá 5 mg octanu zinočnatého v pevnej forme na 1 mg cefalosporínu C prítomného v eluáte. Po 30 minútach miešania sa ešte pridá 2500 ml acetónu. Po 5 hodinách miešania pri teplote 3 až 5 °C sa v matečných lúhoch nameralo 200 μg cefalosporínu C v 1 ml. Vylúčený, ťažko rozpustný Zn-komplex cefalosporínu C sa oddelí, premyje studenou vodou, acetónom a vysuší. Týmto postupom sa získa 11,8 g Zn-komplexu CFS-C o čistote 85,3 %.

Použitý sorbent Ostion SP-1 sa regeneruje 12 l 2% vodného roztoku NaOH. Náplň sa potom premýva 2 l vody, 4 l 1% kyseliny sírovej a potom znovu 8 l vody. Za týmto sa náplň premyje 15 l acetónu a nakoniec sa dokonale premyje vodou. Merné zaťaženie vo všetkých stupňoch sa pohybovalo v rozmedzí 1 až 2 hodiny⁻¹.

Príklad 2

Postupuje sa ako v príklade 1, s tým rozdielom, že na elúciu cefalosporínu C zo sorbentu sa použije 3,2% vodný roztok n-butanolu a filtrát sa spracuje na sorbente Diaion HP-20. Na 250 ml náplne Diaion HP-20 sa adsorbuje 500 ml kyslého filtrátu obsahujúceho 3400 $\mu\text{g/ml}$ cefalosporínu C. Po desorpcii cefalosporínu C zo sorbentu za použitia vyššie uvedeného eluentu sa nameria v eluátoch 73 % z pôvodne purifikovaného množstva cefalosporínu C. K eluátu, ktorý obsahuje 7500 μg cefalosporínu C v 1 ml, sa pridá 8 mg octanu zinočnatého na 1 mg cefalosporínu C a potom 1,25 ml acetónu na 1 ml eluátu. Získa sa 1,3 g Zn-komplexu cefalosporínu C o čistote 80 %.

200 022

Použitý sorbent Diaion HP-20 sa regeneruje postupom uvedeným v príklade 1.

Príklad 3

Postupuje sa ako v príklade 1, s tým rozdielom, že na desorpciu cefalosporínu C zo sorbentu SP-1 sa použije 0,2 M vodný roztok octanu amónneho o pH 5,5. 5000 ml filtrátu získaného postupom v príklade 1 a obsahujúcim 2850 $\mu\text{g/ml}$ cefalosporínu C sa purifikuje na sorbente Ostion SP-1. Po desorpcii cefalosporínu C za použitia hore uvedeného roztoku octanu amónneho sa získa 3100 ml hlavných eluátových frakcií, ktoré obsahovali 5050 $\mu\text{g/ml}$ cefalosporínu C. V sekundárnych eluátových frakciách sa nameria 5,2 % z pôvodne purifikovaného množstva cefalosporínu C. Hlavné eluátové frakcie sa rozdelia na dve časti a pripraví sa Zn-komplex cefalosporínu C nižšie uvedenými spôsobmi.

Jedna časť eluátov sa zráža 8 mg octanu zinočnatého na 1 ml cefalosporínu C a 1 ml acetónu na 1 ml eluátu. Získa sa 8,6 g Zn-komplexu cefalosporínu C o čistote 81,5 %.

V druhej časti eluátov sa hodnota pH z pôvodnej 4,7 upraví s hydroxidom amónnym na hodnotu 5,3 a potom sa zráža ako v prvej časti. Získa sa 8,1 g Zn-komplexu cefalosporínu C o čistote 77 %.

Príklad 4

500 ml filtrátu sa purifikuje na 250 ml náplne sorbentu Diaion HP-20 spôsobom uvedeným v príklade 3, s tým rozdielom, že na elúciu sa použije 0,05 M octan amónny o pH 4,2. Získa sa eluát obsahujúci 7800 $\mu\text{g/ml}$ cefalosporínu C, v ktorom je prítomné 75 % z purifikovaného množstva cefalosporínu C. Z takto získaného eluátu sa postupom uvedeným v príklade 1 pripraví Zn-komplex cefalosporínu C o čistote 87 %.

Príklad 5

Postupuje sa ako v príklade 3, s tým rozdielom, že cefalosporín C sa zo sorbentu SP-1 desorbuje 1 M vodným roztokom octanu amónneho o pH 6,9 a na vyzrážanie Zn-komplexu cefalosporínu C z eluátu sa použije 10 mg octanu zinočnatého na 1 mg cefalosporínu C a 1,5 ml acetónu na 1 ml eluátu. Získa sa jemná zrazenina Zn-komplexu cefalosporínu C o čistote 80 % a množstve 68 % z purifikovaného množstva cefalosporínu C.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob izolácie cefalosporínu C z fermentačnej pôdy, spracovaním získaného filtrátu okyslenej fermentačnej pôdy neionogennými sorbentami vyznačujúci sa tým, že desorpcia na živici adsorbovaných zložiek sa robí elúciou vodným roztokom n-butanolu, alebo acétovým tlmivým roztokom, pričom z takto získaných bohatých eluátov sa získajú vyzráža-

ním ťažko rozpustné soli, alebo komplexy cefalosporínu C, ktoré sa odseparujú a vysušia.

2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že ako elučné činidlo sa použije 3 až 6,5% vodný roztok n-butanolu.
3. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že ako elučné činidlo sa použije 0,05 až 1,00 M acetátový tlmivý vodný roztok zložený z kyseliny octovej a hydroxidu amónneho, majúci pH 4,0 až 7,0.