

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243656 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **425775**

(22) Data zgłoszenia: **2018.05.30**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2019.12.02 BUP 25/2019**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.09.25 WUP 39/2023**

(51) MKP:

C07K 1/14 (2006.01)

C07K 1/12 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

B01D 15/08 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**INVENTIONBIO SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Bydgoszcz, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

KUŁAŻYŃSKI MAREK, Wrocław, PL

MARCIN ŁUKASZEWICZ, Wrocław, PL

HANNA FAŁTYNOWICZ, Wisznia Mała, PL

(74) Pełnomocnik:

Mariusz Kondrat, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

Sposób usuwania lipopeptydów z roztworów i zmiana ich struktury

PL 243656 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób usuwania lipopeptydów z roztworów i zmiana ich struktury.

Biosurfaktanty są związkami powierzchniowo czynnymi produkowanymi przez mikroorganizmy lub otrzymywanymi na drodze biotransformacji. Przy zachowaniu doskonałej zdolności do obniżania napięcia powierzchniowego na granicy faz, są biodegradowalne i mniej toksyczne oraz bardziej odporne na skrajne warunki środowiska niż ich syntetyczne odpowiedniki.

Lipopeptydy są grupą biosurfaktantów, których cząsteczki zbudowane są z cyklicznego peptydu oraz przyłączonej do niego za pomocą estrowego wiązania laktonowego reszty β -hydroksykwasu tłuszczowego. Najlepiej poznanym lipopeptydem jest surfaktyna, produkowana przez różne szczepy z rodzaju *Bacillus*. Występuje ona w postaci szeregu homologów, które różnią się długością łańcucha węglowego – 12–17 at. C jak opisano w publikacji P. Biniarz i M. Łukaszewicz, "Direct quantification of lipopeptide biosurfactants in biological samples via HPLC and UPLC-MS requires sample modification with an organic solvent," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 101, 15 no. 11, pp. 4747–4759, 2017, a nawet 18 at. C, jak podano w publikacji S. Dufour, M. Deleu, K. Nott, B. Wathelet, *et al.*, Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties. *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* 2005, 1726, 87–95, lub składem bądź sekwencją aminokwasów w pierścieniu peptydowym.

Surfaktyna może ulegać hydrolizie pod wpływem różnych czynników, co prowadzi do powstania nowych biosurfaktantów o innych właściwościach. Hydrolizie ulega wiązanie laktonowe, bądź jedno z wiązań peptydowych, wskutek czego następuje otwarcie cyklicznego peptydu i powstają liniowe analogi surfaktyny.

Znane są przypadki hydrolizy zachodzące na drodze zasadowej, gdzie następuje zmydlenie wiązania estrowego, pod wpływem działania wodorotlenku sodu (NaOH) w metanolu, co opisano w zgłoszeniu patentowym US20060166869, lub pod wpływem działania metanolami sodu w metanolu jak opisano w publikacji T. Imura, S. Ikeda, K. Aburai, T. Taira i D. Kitamoto, "Interdigitated Lamella and Bicontinuous Cubic Phases Formation from Natural Cyclic Surfactin and Its Linear Derivative," *J. Oleo Sci.*, vol. 62, no. 7, pp. 499–503, 2013, bądź wodnego roztworu wodorotlenku sodu lub amonu, jak podano w patencie JPH0892279.

Znane są przypadki hydrolizy zachodzące na drodze kwasowej, co opisano w patencie JPH0892279. Ma ona miejsce na skutek działania kwasem solnym na cykliczną surfaktynę.

Znana jest również hydroliza enzymatyczna, którą indukują enzymy wydzielane przez mikroorganizmy. Szczep *Streptomyces* sp. Mg1 produkuje enzym – hydrolazę surfaktyny, który również prowadzi do hydrolizy wiązania laktonowego, co opisano w publikacji B. C. Hoefler, K. V. Gorzelnik, J. Y. Yang, N. Hendricks, P. C. Dorrestein i P. D. Straight, "Enzymatic resistance to the lipopeptide surfactin as identified through imaging mass spectrometry of bacterial competition," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 32, pp. 13082–13087, 2012. Z kolei V8 endoproteaza, pozyskana ze *Staphylococcus aureus*, powoduje hydrolizę wiązania peptydowego pomiędzy kwasem glutaminowym (L-Glu1) i leucyną (L-Leu2), co opisano w publikacji I. Grangemard, J. Wallach i F. Peypoux, "Evidence of surfactin hydrolysis by a bacterial endoprotease," *Biotechnol. Lett.*, vol. 21, no. 3, pp. 241–244, 1999). Znane są również przypadki enzymatycznej hydrolizy innych związków z grupy lipopeptydów, np. antybiotyku daptomycyny. W publikacji V. M. D'Costa *et al.*, "Inactivation of the lipopeptide antibiotic daptomycin by hydrolytic mechanisms," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 2, pp. 757–764, 2012 przedstawiono badania jego podatności na biodegradację przez 60 odpornych na daptomycynę promieniowców (*Actinomycetales*), z których 44% powodowało hydrolizę daptomycyny, a 29% jej deacylację.

Liniowe lipopeptydy mogą być również wytwarzane bezpośrednio przez mikroorganizmy. Trzy lipopeptydy wytwarzane przez szczep *Bacillus subtilis* KCTC 12411BP są tematem zgłoszenia patentowego KR20180003520A H.J. Shin, F.S. Tareq, H.S. Lee, J.S. Lee Y.J. Lee, M.A. Lee „Gageostatins lipotetrapeptides produced from a marine-derived *Bacillus subtilis* having antimicrobial activity”. Posiadają one identyczny skład aminokwasów w części peptydowej jak surfaktyna, ale o odmiennej konfiguracji chiralnej (LLLDDLLL w porównaniu do LLDLLDL w surfaktynie). Istnieje również możliwość modyfikacji genetycznej mikroorganizmów produkujących w stanie naturalnym lipopeptydy cykliczne. Nie otrzymano jednak w ten sposób liniowych analogów surfaktyny, a jedynie lipopeptydy o krótszych sekwencjach aminokwasów (De Ferra, F., Rodriguez, F., Tortora, O., Tosi, C., Grandi, G., Engineering of peptide synthetases. Key role of the thioesterase-like domain for efficient production of recombinant

peptides. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 25304–25309; Stachelhaus, T., Schneider, A., Marahiel, M., Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science* 1995, 269, 69–72).

W przypadku hydrolizy enzymatycznej wiązania peptydowego jej wydajność wynosiła max. 14%, natomiast hydroliza enzymatyczna wiązania laktonowego pozwoliła na uzyskanie 95% konwersji surfaktyny cyklicznej do liniowej. Zasadowa hydroliza chemiczna wiązania laktonowego prowadziła do otrzymania końcowego produktu z 97% wydajnością, zaś hydroliza kwasowa – tylko z 56% wydajnością. Hydroliza chemiczna wymaga jednak użycia toksycznych (metanol) i korozyjnych (NaOH, NH₃ H₂O lub HCl) związków, co czyni ten proces mało przyjaznym środowisku.

Celem rozwiązania według wynalazku jest uzyskanie produktu o wysokiej czystości. Zanieczyszczenia cyklicznymi formami lipopeptydów są minimalne przy jednoczesnym ograniczeniu stosowania nieprzyjaznych środowisku związków chemicznych podczas hydrolizy.

Istota sposobu według wynalazku polega na tym, że wydzielanie lipopeptydów odbywa się z roztworów zawierających wodę na drodze sorpcji, a w przypadku cyklicznych lipopeptydów, w których pierścień peptydowy jest zamknięty poprzez wiązanie laktonowe, dodatkowo sorpcja połączona jest z reakcjami hydrolizy zachodzącymi na powierzchni węgla aktywnego, prowadzącymi do linearyzacji na skutek rozerwania wiązania laktonowego.

Korzystnie, gdy proces adsorpcji i/lub desorpcji na węglu aktywnym prowadzi się przy użyciu mikrofal, pola magnetycznego lub prądu elektrycznego.

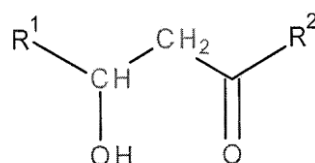
Korzystnie, gdy proces prowadzony jest w przepływie lub układzie stacjonarym.

Korzystnie, gdy węgiel aktywny jest w postaci ziarnistej, sypkiej lub monolitycznych kształtek.

Korzystnie, gdy węgiel aktywny charakteryzuje się powierzchnią powyżej 600 m²/g, a pH jego wodnej zawiesiny jest powyżej 6.

Korzystnie, gdy liniowe lipopeptydy rozdziela się przy użyciu znanych metod.

Korzystnie, gdy struktury liniowych lipopeptydów otrzymanych według sposobu przyjmują formuły chemiczne w postaci:



gdzie:

R¹ – grupa alkilowa o liczbie at. C ≥ 4 oraz konfiguracji liniowej, izo- lub anteizo-;

R² – peptyd zakończony C-końcem o dowolnej sekwencji aminokwasów i długości od 4 do 12 aminokwasów.

Zaletą rozwiązania jest prowadzenie hydrolizy surfaktyny na węglu aktywnym jako katalizatorze procesu niezagrażającym środowisku. Ponadto, węgiel aktywny jest łatwo dostępnym produktem naturalnym. Może być stosowany jako katalizator wielokrotnego użycia, zaś po zużyciu w prosty i tani sposób poddany regeneracji, np. na drodze termicznej obróbki. Istotną zaletą jest prowadzenie hydrolizy przy minimalizacji stosowania nieprzyjaznych środowisku związków chemicznych takich jak metanol, zasady lub kwasy. Hydroliza w tym przypadku prowadzona jest w roztworze wodnym. Ponadto w ten sposób można uzyskać produkt o wysokiej czystości, w bardzo niewielkim stopniu zanieczyszczony cyklicznymi formami surfaktyny. Uzyskiwane produkty z wydajnością nawet 95% są w pełni biodegradowalne.

Przykład 1

Z roztworu pofermentacyjnego zawierającego mieszaninę lipopeptydów, z dominującym udziałem surfaktyny, wydziela się znanym sposobem surfaktynę. Otrzymany wodny roztwór surfaktyny o stężeniu 0,8 mg/ml wprowadza się w ilości 100 ml do kolby stożkowej o poj. 250 ml. Następnie wprowadza się 1 gram węgla aktywnego o uziarnieniu od 0,2 do 1 mm i o powierzchni porów wynoszącej 650 m²/g oraz charakteryzującego się pH jego wodnej zawiesiny wynoszącym 8,5. Zawiesina jest mieszana przy pomocy wytrząsarki przez 72 godziny w temperaturze 20°C. Po tym czasie roztwór jest oddzielany od węgla aktywnego przez sączenie i wirowanie. Na węglu aktywnym pozostaje zaadsorbowana surfaktyna w ilości 5% początkowo wprowadzonej do roztworu. Pozostała część surfaktyny reaguje na powierzchni węgla aktywnego tworząc hydrolizat surfaktyny o linearnej strukturze przedstawionej wzorami (I) i (II).

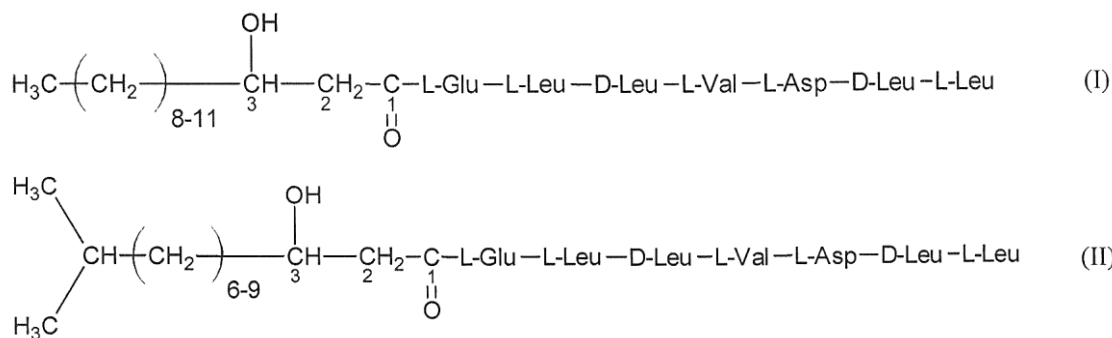
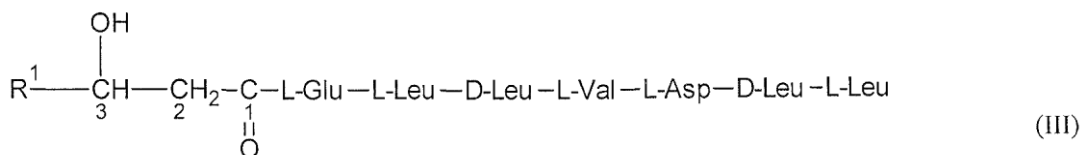


Fig. 1 Wzory liniowych analogów surfaktyny, o sekwencji aminokwasów L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu, w których reszta β -hydroksykwasu tłuszczowego zbudowana jest z 12–15 at. C i ma konfigurację liniową (I) lub izo- (II).

Przykład 2

Jak w przykładzie 1 z tym, że stężenie wodnego roztworu surfaktyny wynosi 2 mg/ml. Następnie wprowadza się 3 gramy węgla aktywnego o uziarnieniu od 0,1 do 0,2 mm i o powierzchni wewnętrznej wynoszącej 750 m²/g oraz charakteryzującego się pH jego wodnej zawiesiny wynoszącym 9. Zawiesina jest mieszana przy pomocy wytrząsarki przez 72 godziny w temperaturze 25°C. Po tym czasie roztwór jest oddzielany od węgla aktywnego za pomocą sączenia i wirowania. Na węglu aktywnym pozostaje zaadsorbowana surfaktyna w ilości 3% początkowo wprowadzonej do roztworu. Pozostała część surfaktyny reaguje na powierzchni węgla tworząc hydrolizat surfaktyny o linearnej strukturze. Mieszanina linearnych produktów jest rozdzielana przy pomocy preparatywnej chromatografii cieczowej na analogi różniące się długością łańcucha alkilowego, których strukturę przedstawia wzór (III).



R¹ – łańcuch alkilowy o l.at. C wynoszącej 9–12

Fig. 2 Wzór liniowego analogu surfaktyny, o sekwencji aminokwasów L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu, w którym reszta β -hydroksykwasu tłuszczowego zbudowana jest z 12–15 at. C i ma konfigurację liniową, izo- lub anteizo-.

Przykład 3

Jak w przykładzie 1 z tym, że roztwór surfaktyny podaje się na kolumnę. Kolumnę wypełnia się 20 gramami węgla aktywnego w formie monolitycznej kształtki o wymiarach oczek 0,5 x 0,5 mm i o grubości ścianki 0,5 mm oraz powierzchni porów wynoszącej 750 m²/g oraz charakteryzującej się pH jej wodnej zawiesiny wynoszącym 9. W temperaturze 25°C, przy użyciu pompy perystaltycznej wprowadzane jest od góry 2000 ml/h wodnego roztworu surfaktyny o stężeniu 2 mg/ml. Roztwór po przejściu przez złożę węgla aktywnego kierowany jest do zbiornika manipulacyjnego, z którego pobierany jest przez pompę w celu prowadzenia procesu w układzie przepływowym. Proces prowadzony jest przez 48 godzin. Na węglu aktywnym pozostaje zaadsorbowana surfaktyna w ilości 10% wprowadzonej początkowo do roztworu. Pozostała część surfaktyny reaguje na powierzchni węgla aktywnego tworząc hydrolizaty surfaktyny o linearnej strukturze, przedstawione wzorami (IV)–(VI), które pozostają w roztworze cyrkulacyjnym. Węgiel może być kilkukrotnie używany w procesie. Regeneracja węgla może być realizowana w kolumnie lub poza nią.

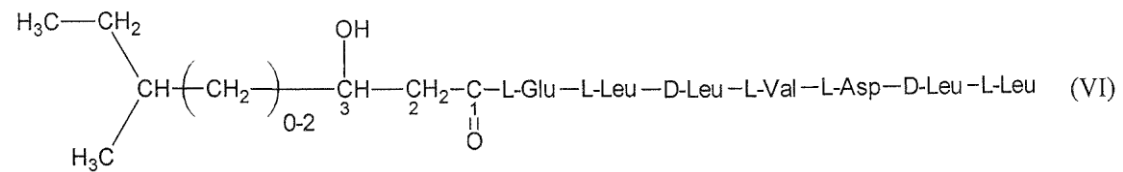
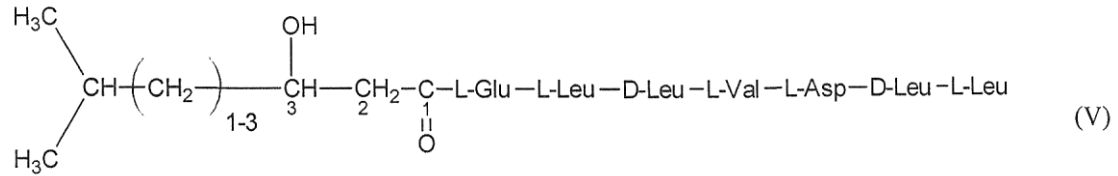
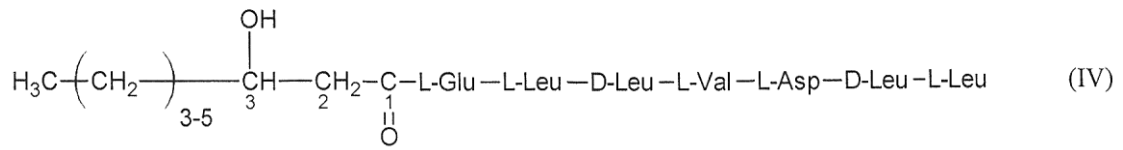


Fig. 3 Wzory liniowych analogów surfaktyny, o sekwencji aminokwasów L-Glu-L-Leu- D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu, w których reszta β -hydroksykwasy tłuszczowego zbudowana jest z 7–9 at. C i ma konfigurację liniową (IV), izo- (V) lub anteizo- (VI).

Przykład 4

Jak w przykładzie 1 z tym, że roztwór surfaktyny podaje się na kolumnę. Kolumnę wypełnia się 20 gramami węgla aktywnego w formie monolitycznej kształtki o wymiarach oczek 0,5 x 0,5 mm i o grubości ścianki 0,5 mm oraz powierzchni wewnętrznej wynoszącej 750 m²/g oraz charakteryzującej się pH jej wodnej zawiesiny wynoszącym 9. Kształtka jest podłączona do prądu elektrycznego w czasie przepływu roztworu. W temperaturze 25°C, przy użyciu pompy perystaltycznej wprowadzane jest od góry 2000 ml/h wodnego roztworu surfaktyny o stężeniu 2 mg/ml. Roztwór przejściu przez złożę węgla aktywnego kierowany jest do zbiornika manipulacyjnego, z którego pobierany jest przez pompę w celu prowadzenia procesu w układzie przepływowym. Proces prowadzony jest przez 48 godzin. Na węglu aktywnym pozostaje zaadsorbowana surfaktyna w ilości 15% wprowadzonej początkowo do roztworu. Pozostała część surfaktyny reaguje na powierzchni węgla aktywnego tworząc hydrolizat surfaktyny o linearnej strukturze, przedstawionej wzorem (VII)–(IX), który pozostaje w roztworze cyrkulacyjnym. Węgiel może być kilkukrotnie używany w procesie.

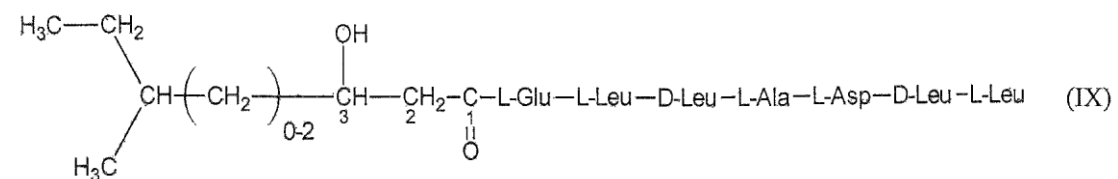
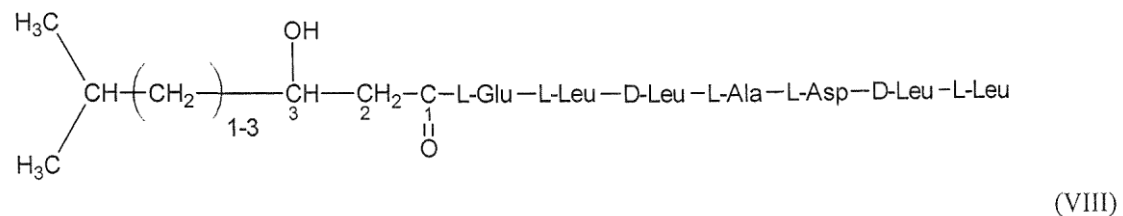
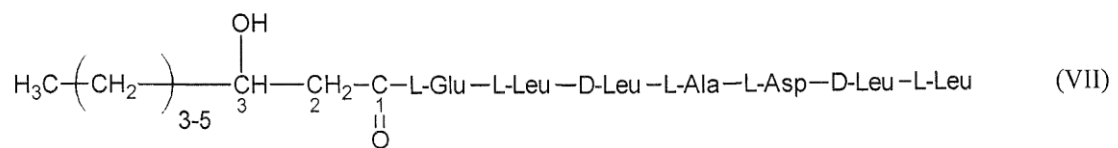


Fig. 4 Wzory liniowych analogów surfaktyny, o sekwencji aminokwasów L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Ala-L-Asp-D-Leu-L-Leu, w których reszta β -hydroksykwasu tłuszczowego zbudowana jest z 7–9 at. C i ma konfigurację liniową (VII), izo- (VIII) lub anteizo- (IX).

Przykład 5

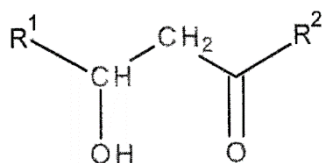
Jak w przykładzie 4 z tą różnicą, że kolumna jest umieszczona w reaktorze mikrofalowym.

Przykład 6

Jak w przykładzie 4 z tą różnicą, że kolumna jest umieszczona w polu magnetycznym.

Przykład 7

Lipopeptydy otrzymane sposobem jak w przykładach od 1 do 6 zanalizowane zostały za pomocą chromatografii cieczowej i spektrometrii mas. Struktury liniowych analogów surfaktyny otrzymanych przedstawionym sposobem przyjmują następującą postać:



R¹ – grupa alkilowa o liczbie at. C ≥ 4 oraz konfiguracji liniowej, izo- lub anteizo-;

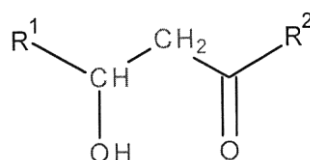
R² – heptapeptyd zakończony C-końcem o sekwencji chiralnej LLDLLDL i sekwencji aminokwasów, przedstawionych w Tab. 1

Tab. 1 Sekwencja aminokwasów w grupie R² (heptapeptyd) liniowych analogów surfaktyny

Nr sekwencji	Numer aminokwasu						
	1	2	3	4	5	6	7
1	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu
2	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Val
3	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Ile
4	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Ile
5	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Val
6	Glu	Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	Leu
7	Glu	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu
8	Glu	Leu	Leu	Ile	Asp	Leu	Leu
9	Glu	Leu	Leu	Ile	Asp	Leu	Ile
10	Glu	Ile	Leu	Ile	Asp	Leu	Ile
11	Glu	Val	Leu	Val	Asp	Leu	Val
12	Glu	Ile	Leu	Val	Asp	Leu	Val
13	Glu	Ile	Leu	Val	Asp	Leu	Ile
14	Gln	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu
15	Gln	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Val
16	Gln	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Ile
17	Gln	Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	Leu
18	Gln	Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	Val
19	Gln	Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	Ile

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób usuwania lipopeptydów z roztworów i zmiana ich struktury z cyklicznej na liniową **znamienny tym**, że wydzielanie lipopeptydów odbywa się z roztworów zawierających wodę na drodze sorpcji, a w przypadku cyklicznych lipopeptydów, w których pierścień peptydowy jest zamknięty poprzez wiązanie laktonowe, dodatkowo sorpcja połączona jest z reakcjami hydrolyzy zachodzącymi na powierzchni węgla aktywnego, prowadzącymi do linearyzacji na skutek rozerwania wiązania laktonowego.
2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że proces adsorpcji i/lub desorpcji na węglu aktywnym prowadzi się przy użyciu mikrofał, pola magnetycznego lub prądu elektrycznego.
3. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że proces prowadzony jest w przepływie lub układzie stacjonarnym.
4. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że węgiel aktywny jest w postaci ziarnistej, sypkiej lub monolitycznych kształtek.
5. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że węgiel aktywny charakteryzuje się powierzchnią powyżej 600 m²/g, a pH jego wodnej zawiesiny jest powyżej 6.
6. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że liniowe lipopeptydy rozdziela się przy użyciu znanych metod.
7. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że struktury liniowych lipopeptydów otrzymanych według sposobu przyjmują formuły chemiczne w postaci:



gdzie:

R¹ – grupa alkilowa o liczbie at. C ≥ 4 oraz konfiguracji liniowej, izo- lub anteizo-;

R² – peptyd zakończony C-końcem o dowolnej sekwencji aminokwasów, i długości od 4 do 12 aminokwasów.