



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **424555**

(51) Int.Cl.  
**B01D 15/30 (2006.01)**  
**C07K 7/64 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **09.02.2018**

---

(54) **Sposób oczyszczania i/lub rozdzielania surfaktyny z wykorzystaniem Chromatografii Przeciwprądowej**

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**12.08.2019 BUP 17/19**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**06.04.2021 WUP 07/21**

(73) Uprawniony z patentu:

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

(72) Twórca(y) wynalazku:

**PAWEŁ HODUREK, Wałbrzych, PL**  
**PAWEŁ JAJOR, Ziębice, PL**  
**MARCIN ŁUKASZEWICZ, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzec. pat. Mariusz Kondrat**

---

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób oczyszczania i/lub rozdzielania surfaktyny za pomocą technik Chromatografii Przeciwnąwowej (ang. Countercurrent Chromatography, CCC), np. za pomocą Odśrodkowej Chromatografii Podziałowej (ang. Centrifugal Partiton Chromatography, CPC), będącej hydrostatycznym wariantem CCC, w układach faz z użyciem wodnych roztworów buforowych, ciekłych alkoholi alifatycznych i ciekłych węglowodorów alifatycznych, w których homologi wykazują współczynniki podziału od 0,1 do 10. Sposób oczyszczania surfaktantów lipopeptydowych pochodzenia naturalnego za pomocą technik Chromatografii Przeciwnąwowej, np. Odśrodkowej Chromatografii Podziałowej, można ponadto prowadzić bez rozdzielania na homologi lub z rozdzielaniem na homologi.

Surfaktanty lipopeptydowe pochodzenia naturalnego są substancjami organicznymi produkowanymi przez wiele różnych grup organizmów, jak również znajdują się w otoczkach niektórych wirusów. Wydajność ich produkcji przez różne grupy organizmów jest jednak zmienna. Obecnie wydaje się, że największą wydajnością charakteryzują się niektóre bakterie w specyficznych warunkach. Np. *Bacillus* sp. (np. *Bacillus subtilis*) produkujący różne formy surfaktyny (zarówno jej analogi jak i homologi), czy też *Pseudomonas* sp. (np. *Pseudomonas fluorescens* BD5) produkujące różne formy pseudofaktyny.

Surfaktanty lipopeptydowe pochodzenia naturalnego są bardzo wydajnymi środkami powierzchniowo czynnymi oraz bardzo wydajnymi emulgatorami. W odróżnieniu jednak od np. mydeł są dużo skuteczniejsze. Natomiast w odróżnieniu od detergentów syntetycznych, są w pełni biodegradowalne, więc nie są aż tak uciążliwe dla środowiska naturalnego jak detergenty syntetyczne. Jak do tej pory nie stwierdzono ich wysokiej toksyczności w stosunku do organizmu ludzkiego, natomiast wykazują działanie bakteriostatyczne, a czasami bakterio- i grzybobójcze. Cechy te sprawiają, że mogą mieć zastosowanie jako emulgator w kremach, obniżając wymaganą ilość konserwantów lub wręcz eliminując ich konieczność, albo np. zastosowanie w nowoczesnych środkach do mycia naczyń i innych powierzchni.

Biosurfaktanty są izolowane (i oczyszczane) od wielu lat różnymi metodami, nie zawsze wydajnymi. Np. surfaktyna z *Bacillus subtilis* często jest izolowana za pomocą kwaśnej precypitacji. Ta najpowszechniejsza metoda otrzymywania surfaktyny powoduje straty sięgające 50% oraz niekiedy pojawia się zanieczyszczenie od np. wolnych kwasów tłuszczowych.

Chromatografia przeciwnąwowa (ang. Countercurrent Chromatography, CCC) jest preparatywną techniką chromatograficzną bazującą na rozdzielaniu pomiędzy dwie niemieszające się cieczki. Jednym z technicznych rozwiązań, tzw. typu hydrostatycznego, jest Odśrodkowa Chromatografia Podziałowa (ang. Centrifugal Partition Chromatography, CPC), gdzie retencja fazy stacjonarnej jest utrzymywana dzięki ciśnieniu hydrostatycznemu generowanemu za pomocą wirówki jednoosiowej z uszczelkami rotacyjnymi. Odśrodkowa chromatografia podziałowa, jak inne metody chromatografii przeciwnąwowej, uchodzi za technikę bezstratną lub niskostratną. Brak efektów adsorpcyjnych na złożu gwarantuje wysokie odzyski z aparatu (pow. 90%). Jednocześnie jest to metoda chromatograficzna, umożliwiająca pozbycie się niechcianych zanieczyszczeń w wydajny sposób.

Odmiernym zagadnieniem jest rozdzielanie mieszaniny biosurfaktantów na składowe (np. homologi strukturalne). Jak do tej pory udawało się to wykonać za pomocą techniki preparatywnej wysokosprawnej chromatografii cieczkowej (prepHPLC), która nie jest techniką wydajną. Jest to technika kosztowna, wymagająca dużej ilości rozpuszczalników o wysokiej klasie czystości. Techniki chromatografii przeciwnąwowej zużywają mniej rozpuszczalników w przeliczeniu na gram czystej substancji, a ponadto mogą korzystać z rozpuszczalników o niższej klasie czystości. W przypadku odśrodkowej chromatografii podziałowej, ponadto brak jest strat rozdzielczości chromatograficznej w przypadku przechodzenia na większą skalę, a fenomen ten jest mocno zaznaczony w przypadku preparatywnej wysokosprawnej chromatografii cieczkowej. Odśrodkowa chromatografia podziałowa jest z roku na rok coraz popularniejszą techniką wśród nowoczesnych metod oczyszczania. W 1993 roku André Durand et al. [WO 1994021622] zgłosili metodę oczyszczania taksoidów, za pomocą CPC. W 2010 roku Matthieu Giraud et al. [WO 2011157803] zgłosili metodę oczyszczania związków amfoterycznych metodą z użyciem specyficznych wymiennicy jonowych. W 2013 roku została zgłoszona do opatentowania metoda oczyszczania oligonukleotydów spośród ich mieszaniny za pomocą technik chromatografii przeciwnąwowej, w tym CPC [WO 2013030263]. Ostatnio coraz częściej pojawiają kolejne patenty na oczyszczanie kolejnych związków chemicznych, np. w 2017 roku firma Rotachrom zgłosiła do patentu kolejne metody oczyszczania, np. baccatyny III, czy też cyklosporyny A za pomocą CPC [WO 2017072542 A1, WO 2017098291]. Metoda oczyszczania surfaktantów lipopeptydowych pochodzenia

naturalnego za pomocą Odśrodkowej Chromatografii Podziałowej wpisuje się w trend coraz większej ilości zgłaszanych wniosków z wykorzystaniem techniki CPC.

Istotą wynalazku jest sposób oczyszczania i/lub rozdzielania surfaktyny z wykorzystaniem Chromatografii Przeciuprądowej (ang. Countercurrent Chromatography, CCC) charakteryzujący się tym, że: oczyszczanie odbywa się w systemie dwóch częściowo mieszających się faz rozpuszczalnikowych sporządzonych z rozpuszczalników wybranych z grupy wodnych roztworów buforowych, ciekłych alkoholi alifatycznych i ciekłych węglowodorów alifatycznych, przy czym roztwory buforowe mają stabilizowane pH w granicach od 2 do 10 a stężenia jonów buforujących zawierają się w zakresie od 2 do 800 mM; węglowodory alifatyczne mają od 5 do 12 atomów węgla, przy czym w tych układach rozpuszczalników, surfaktant, o którym mowa, wykazuje współczynnik podziału w zakresie 0,1 do 10; przy czym obie fazy rozpuszczalnikowe sporządzone są z rozpuszczalnika składającego się z mieszaniny: wodnego roztworu buforowego, metanolu; n-Butanolu oraz n-Heksanu zmieszanych w proporcji odpowiednio 3:2:3:2, objętościowo, a wodny roztwór buforowy zawiera fosforan dwusodowy, chlorek sodowy i wersenian dwusodowy.

Korzystnie, oczyszczanie i/lub rozdzielanie surfaktantów lipopeptydowych pochodzenia naturalnego odbywa się za pomocą Odśrodkowej Chromatografii Podziałowej (ang. Centrifugal Partition Chromatography, CPC), będącej jedną z wersji hydrostatycznego typu Chromatografii Przeciuprądowej (ang. Countercurrent Chromatography, CCC).

W odśrodkowej chromatografii podziałowej, jak w każdej technice chromatografii przeciuprądowej, stosuje się system (rozpuszczalników), który stanowi unikalna kompozycja dwóch faz ciekłych będących względem siebie w stanie równowagi, pomiędzy którymi możliwy jest proces chromatografii przeciuprądowej.

Oczyszczanie surfaktyn z podziałem na homologii lub bez można prowadzić w kilku trybach pracy: tryb wznoszący (skrót: ASC, ang. ascending mode) jest to tryb pracy, który umożliwia stosowanie cięższej cieczy jako fazy stacjonarnej i lżejszej cieczy jako fazy ruchomej. Wówczas, w CPC, przepływ przez komórki podziałowe odbywa się w stronę do osi obrotu rotora, czyli ze zwrotem przeciwnym sile odśrodkowej.

Tryb opadający (skrót: DSC, ang. descending) jest to tryb pracy, który umożliwia stosowanie fazy lżejszej jako fazy stacjonarnej i cięższej jako fazy ruchomej. Wówczas, w CPC, przepływ przez komórki podziałowe odbywa się w stronę od osi obrotu rotora, czyli ze zwrotem zgodnym z siłą odśrodkową.

Dual-mode (skrót: DM, polskiego tłumaczenia brak) jest to tryb pracy polegający na zamianie miejscami fazy ruchomej i stacjonarnej w celu np. zwiększenia rozdzielczości chromatograficznej (czyli: najpierw ASC, później DSC (lub na odwrót)).

Multiple dual-mode (skrót: MDM, polskiego tłumaczenia brak) jest to tryb pracy polegający na kilkukrotnej zamianie miejscami fazy ruchomej i stacjonarnej. Jako rozpuszczalniki stosowane do sporządzenia systemu rozpuszczalników do oczyszczania surfaktantów lipopetydowych pochodzenia naturalnego stosuje się roztwory buforowe, które mają stabilizowane pH w granicach od 2 do 10 a stężenia jonów buforujących zawierają się w zakresie od 2 do 500 mM, przy czym wodne roztwory buforowe mogą zawierać dodatkowe składniki stabilizujące, korzystnie sole pomocnicze (wprowadzające odpowiednie stężenie jonów towarzyszących i moderujące siłę jonową, np. NaCl); węglowodory alifatyczne proste, rozgałęzione lub cykliczne, o ilości węgla od 1 do 10.

Wynalazek został bliżej przedstawiony w poniższych przykładach wykonania oraz na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia przykładowy chromatogram oczyszczania surfaktyny otrzymanej z bakterii *Bacillus subtilis*, bez rozdzielania na homologii oraz fig. 2 przedstawia oczyszczanie surfaktyny otrzymanej z bakterii *Bacillus subtilis*, z rozdzielaniem na homologii.

**Przykład 1.** Oczyszczanie surfaktyny otrzymanej z bakterii *Bacillus subtilis*, bez rozdzielania na homologii:

Używane komponenty systemu:

1. Wodny roztwór buforowy zawierający stężeniach: 20 mM fosforanu dwusodowego, 50 mM chlorku sodowego i 5 mM wersenianu dwusodowego (EDTA dwusodowy),
2. Metanol,
3. n-Butanol,
4. n-Heksan.

System rozpuszczalników przygotowano w proporcji odpowiednio 3:2:3:2., w kolejności komponentów powyżej.

Sporządzenie preparatu:

Około 1,2 g oczyszczonego preparatu zawieszono w 40 ml powyższego systemu rozpuszczalników (po tej samej ilości fazy górnej i dolnej) i odwirowano pozostałości przez 10 min przy przyspieszeniu nie mniejszym niż 1500 g i nie większym niż 2500 g, a supernatant przeniesiono do czystego pojemnika. Ponownie zwirowano, tym razem krótko (około minuty, 1500 g), aby fazy się odseparowały.

Używany moduł do CPC:

Wirówka z rotorem o pojemności 1 litr i ilością komórek podziałowych nie mniej niż 1800, np.: Armen SCPC 1 L.

Przygotowanie kolumny chromatograficznej zostało przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1

Czas akcji [min : s]	Tryb elucji (pozycja zaworu)	Faza cięższa (udział) %	Faza lżejsza (udział) %	Przepływ [ml/min]	Obroty rotora [RPM]
0:00	ASC	100	0	100	500
13:00	ASC	100	0	100	500
13:03	ASC	0	100	30	1500
35:00	ASC	0	100	30	1500
38:00	ASC	0	100	8	1500
40:00	ASC	0	100	8	1500

Na tak przygotowaną kolumnę nastrzyknąć około 20 ml preparatu rozpuszczonego w fazach systemu.

Programu elucyjny, wersja z napełnianiem rotora i bez ekstruzji według poniższej tabeli 2:

Tabela 2

Czas akcji [h : min : s]	Tryb elucji (pozycja zaworu)	Faza cięższa (udział) %	Faza lżejsza (udział) %	Przepływ [ml/min]	Obroty rotora [RPM]
0:00	<b>ASC</b>	0	100	8	1500
5:00	<b>ASC</b>	0	100	8	1500
35:00	<b>ASC</b>	0	100	15	1500
1:02:00	<b>ASC</b>	0	100	15	1500
1:02:03	<b>DSC</b>	100	0	12	1500
2:40:00	<b>DSC</b>	100	0	12	1500

Należy zbierać frakcje w kolektorze w zakresie czasu od 1:35:00 do 2:40:00, monitorując absorbancję przy którejś z długości fal z zakresu 205 do 220 nm, np. przy 207 nm.

Czystość uzyskanej w ten sposób surfaktyny wynosi >90%, przy czym jest to mieszanina homologów.

**Przykład 2.** Oczyszczanie surfaktyny otrzymanej z bakterii *Bacillus subtilis*, z rozdzielaniem na homologi:

Homologi to grupa podobnych związków chemicznych tworzących tzw. „szereg homologiczny”, w którym następnym związkiem różni się od poprzednich ugrupowaniem (łącznikiem) metylenowym (CH<sub>2</sub>).

Używane komponenty systemu:

1. Wodny roztwór buforowy zawierający stężeniach: 20 mM fosforanu dwusodowego, 50 mM chlorku sodowego i 5 mM wersenianu dwusodowego (EDTA dwusodowy),
2. Metanol,
3. n-Butanol,
4. n-Heksan.

System rozpuszczalników należy wykonać w proporcji odpowiednio 3:2:3:2, w kolejności komponentów powyżej.

Sporządzenie preparatu:

Należy zawiesić około 1,2 g preparatu oczyszczanego w 40 ml systemu (po tej samej ilości fazy górnej i dolnej). Po zawieszeniu odwirować pozostałości 10 min. W przyspieszeniu nie mniejszym niż 1500 g i nie większym niż 2500 g, a supernatant przenieść do czystego pojemnika. Ponownie zwirować, tym razem krótko, aby fazy się odseparowały.

Używany moduł do CPC:

Wirówka z rotorem o pojemności 1 litr i ilością komórek podziałowych nie mniej niż 1800, np.: Armen SCPC 1 L.

Przygotowanie kolumny chromatograficznej według poniższej tabeli 3:

Tabela 3

Czas akcji [min : s]	Tryb elucji (pozycja zaworu)	Faza cięższa (udział) %	Faza lżejsza (udział) %	Przepływ [ml/min]	Obroty rotora [RPM]
0:00	<b>ASC</b>	100	0	100	500
13:00	<b>ASC</b>	100	0	100	500
13:03	<b>ASC</b>	0	100	30	1500
35:00	<b>ASC</b>	0	100	30	1500
38:00	<b>ASC</b>	0	100	8	1500
40:00	<b>ASC</b>	0	100	8	1500

Na tak przygotowaną kolumnę nastrzyknąć około 5 ml preparatu, preferowana jest przy nastrzyku faza górna.

Programu elucyjny, wersja z napełnianiem rotora i bez ekstruzji według poniższej tabeli 4:

Tabela 4

Czas akcji [h : min : s]	Tryb elucji (pozycja zaworu)	Faza cięższa (udział) %	Faza lżejsza (udział) %	Przepływ [ml/min]	Obroty rotora [RPM]
0:00	<b>ASC</b>	0	100	8	1500
5:00	<b>ASC</b>	0	100	8	1500
35:00	<b>ASC</b>	0	100	15	1500
1:02:00	<b>ASC</b>	0	100	15	1500
1:02:03	<b>DSC</b>	100	0	12	1500
1:54:00	<b>DSC</b>	100	0	12	1500
1:54:03	<b>ASC</b>	0	100	12,0	1500
3:20:00	<b>ASC</b>	0	100	21,5	1500

Należy zbierać frakcje w kolektorze w zakresie czasu od 2:20:00 do 3:10:00, monitorując absorbancję przy którejś z długości fal z zakresu 205 do 220 nm, np. przy 207 nm. Wielkość zbieranych frakcji powinna mieścić się w zakresie 15–20 ml.

Rozdzielone w ten sposób homologi surfaktyny nadal są zanieczyszczone sobą wzajemnie. Tylko niektóre, wybrane frakcje uzyskują czystość 80% danego homologu. Dotyczy to głównie homologów C13, C14 i C15. Dlatego należy zbadać analityczne wybrane frakcje, które (po oglądzie chromatogramu CPC) wydają się interesujące i wybrać do dalszych prac tylko te, których czystość (od innych homologów) jest zadowalająca (np.  $\geq 75\%$ ).

Należy przy tym pamiętać, że czystość uzyskanej w ten sposób surfaktyny jako całości (bez uwzględnienia podziału na homologi) wynosi  $\geq 90\%$ .

### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oczyszczania i/lub rozdzielania surfaktyny z wykorzystaniem Chromatografii Przeciuprądowej (ang. Countercurrent Chromatography, CCC), **znamienny tym**, że oczyszczanie odbywa się w systemie dwóch częściowo mieszających się faz rozpuszczalnikowych sporządzonych z rozpuszczalników wybranych z grupy wodnych roztworów buforowych, ciekłych alkoholi alifatycznych i ciekłych węglowodorów alifatycznych, przy czym roztwory buforowe mają stabilizowane pH w granicach od 2 do 10 a stężenia jonów buforujących zawierają się w zakresie od 2 do 800 mM; węglowodory alifatyczne mają od 5 do 12 atomów węgla, przy czym w tych układach rozpuszczalników, surfaktant, o którym mowa, wykazuje współczynnik podziału w zakresie 0,1 do 10; przy czym obie fazy rozpuszczalnikowe sporządzone są z rozpuszczalnika składającego się z mieszaniny: wodnego roztworu buforowego, metanolu; n-Butanolu oraz n-Heksanu zmieszanych w proporcji odpowiednio 3:2:3:2, objętościowo, a wodny roztwór buforowy zawiera fosforan dwusodowy, chlorek sodowy i wersenian dwusodowy.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że odbywa się za pomocą Odśrodkowej Chromatografii Podziałowej (ang. Centrifugal Partition Chromatography, CPC).

## Rysunki

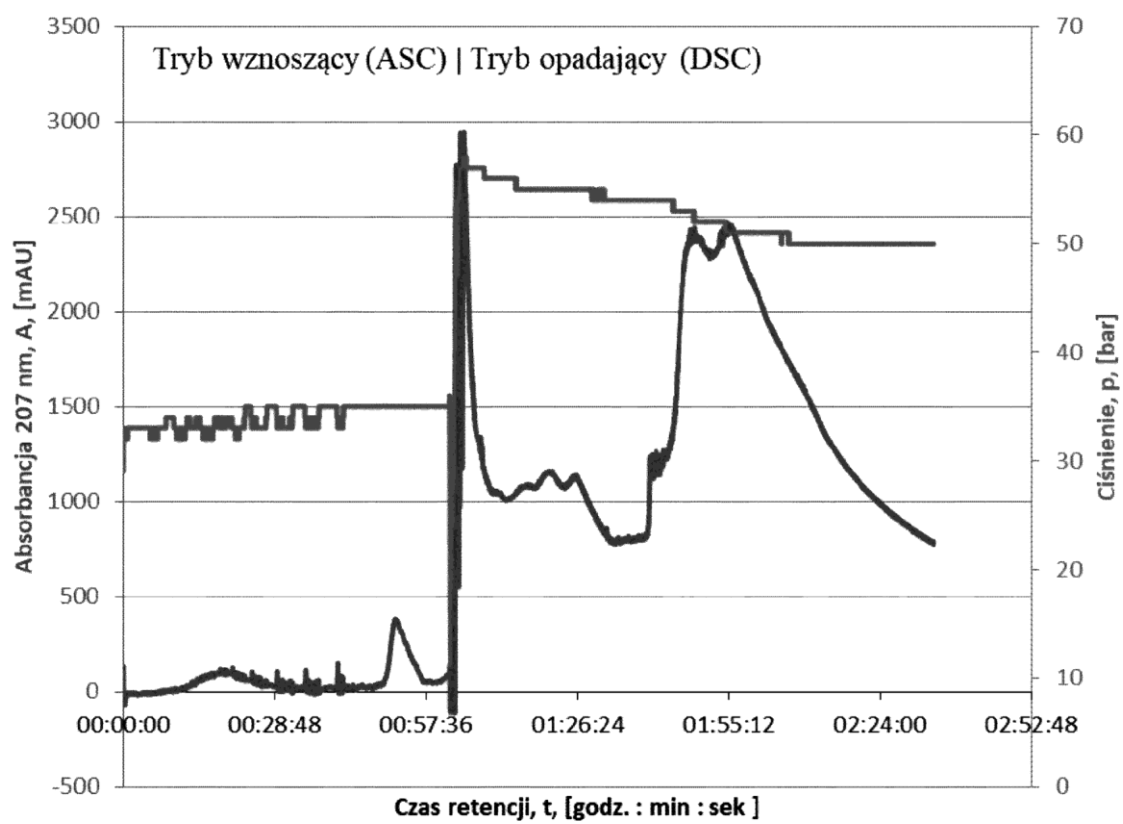


Fig. 1

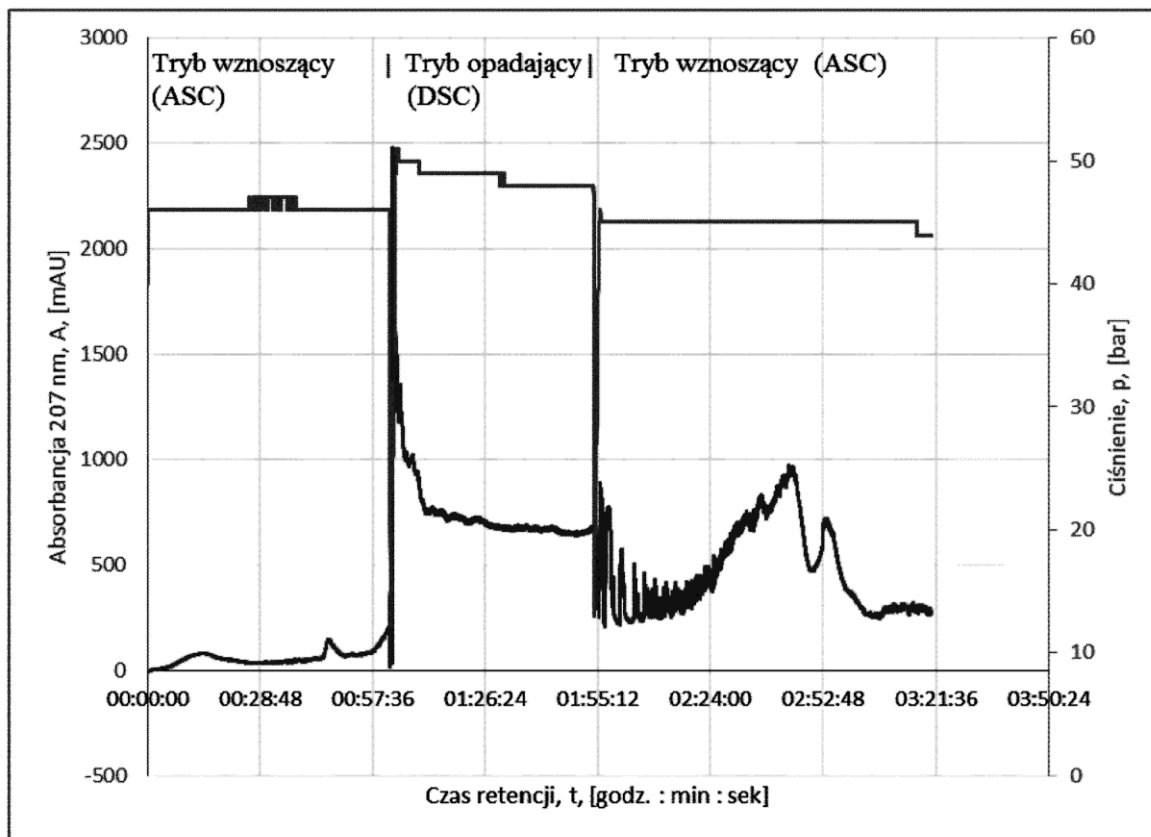


Fig. 2