



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

260068

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 1/20

(22) Přihlášeno 20 02 87

(21) PV 1138-87.R

(40) Zveřejněno 15 03 88

(45) Vydáno 15 05 89

(75)

Autor vynálezu

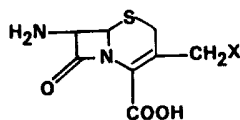
PLHÁČKOVÁ KAMILA RNDr., BARTA MIROSLAV RNDr., NETRVAL JIŘÍ RNDr.,
VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc., PILÁT PETR ing. CSc.,
KRUMPHANZL VLADIMÍR člen korespondent ČSAV, PRAHA

(54) Kmen mikroorganismu *Pseudomonas* sp. CCM 3987 s vysokou produkcí
hydrolázy 7/3-(4-karboxybutanamido)cefalosporánové kyseliny

Řešení se týká nového kmene mikro-
organismu *Pseudomonas* sp. CCM 3 987,
produkující ve zvýšeném množství vnitro-
buněčný enzym, hydrolázu 7 β -(4-karboxy-
butanamido)cefalosporánové kyseliny, pro
přípravu 7-aminocefemsloučenin, zejména
7-aminocefalosporánové kyseliny, která
je výchozím meziproduktem pro výrobu
polosyntetických cefalosporinů, například
cefazolinu.

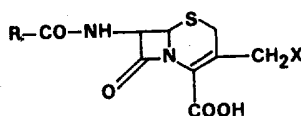
Vynález se týká kmene mikroorganismu *Pseudomonas* sp. CCM 3 987 s vysokou produkcí hydrolázy 7-beta-(4-karboxybutanamido)cefalosporánové kyseliny použitelného pro enzymovou přípravu 7-aminocefemsloučenin zejména pro přípravu 7-aminocefalosporánové kyseliny (dále jen 7-ACK). 7-ACK je významný meziprodukt pro přípravu polosyntetických cefalosporinových antibiotik, např. cefazolinu.

Je známo, že působením specifického enzymu hydrolyzujícího amidickou vazbu, hydrolázy 7-beta-(4-karboxybutanamido)cefalosporánové kyseliny (dále jen glutaryl-7-ACK), lze získávat 7-aminocefemsloučeniny obecného vzorce I



(I),

ve kterém X značí atom vodíku, skupinu -OH, -OCOCH₃ nebo nukleofilní skupinu, z jejich 7-acylaminoderivátů obecného vzorce II



(II),

ve kterém R značí skupinu -(CH₂)₃-COOH nebo -(CH₂)₃-CO-COOH a X značí totéž co ve vzorci I.

Mikrobiální kmeny s aktivitou uvedeného enzymu lze použít pro dvoustupňovou enzymovou technologii přípravy 7-ACK z cefalosporinu C, tj. sloučeniny obecného vzorce II, ve kterém X značí skupinu -OCOCH₃ a R skupinu -(CH₂)₃-CHNH₂-COOH. Tato enzymová technologie zahrnuje přípravu 7-acylaminocefemsloučenin obecného vzorce III, kde R značí skupinu -(CH₂)₃-COOH, to jest 7-beta-(4-karboxybutanamido)cefalosporánové kyseliny neboli 3-acetometoxymetyl-7-beta-(4-karboxybutanamido)-cef-3-em-4-karboxylové kyseliny, a její následnou hydrolýzu.

Zmíněné 7-acylaminocefemsloučeniny lze získat z cefalosporinu C, a popř. z jeho derivátů buď chemicky (japonské patentové spisy č. 7 777 078 a 78 112 891) nebo enzymaticky působením permeabilizovaných resp. imobilizovaných buněk, producentů oxidázy D-aminokyselin (bristký patentový spis č. 1 272 769, japonské patentové spisy č. 7 688 694, č. 7 744 695, č. 77 125 696, č. 77 128 295 a č. 79 154 592 a čs. autorské osvědčení č. 251 457, závislé na čs. autorském osvědčení č. 231 458)

Pro hydrolýzu uvedených 7-acylaminocefemsloučenin jsou popsány kmeny *Pseudomonas ovalis*, *Comamonas* (japonské patentové spisy č. 75 101 584 a č. 7 670 884), *Bacillus*, *Arthrobacter* a *Alcaligenes* (japonské patentové spisy č. 77 128 293 a č. 7 886 094).

V čs. autorském osvědčení č. 239 293 je popsán kmen *Pseudomonas* sp. CCM 3 635 vykazující konstitutivní syntézu vnitrobuněčné hydrolázy glutaryl-7-ACK, takže není nutno do kultivačních živných půd přidávat induktor syntézy enzymy, glutarovou kyselinu. Další výhodou tohoto kmene je, že nevykazuje nežádoucí aktivitu beta-laktamáz.

Předmětný vynález se týká nového mikrobiálního vysokoprodukčního kmene, který byl odvozen z rodičovského kmene *Pseudomonas* sp. CCM 3 635 chemickou mutagenézí a výběrem monokloniových izolátů, jehož výhoda ve srovnání s původním kmenem je více jak dvojnásobná specifická aktivita hydrolázy glutaryl-7-ACK, při zachování původních vlastností rodičovského kmene, které jsou z průmyslového hlediska výhodné, tj. syntéza tohoto enzymu v nepřítomnosti induktoru v živné

půdě (konstitutivita) a neschopnost syntetizovat beta-laktamázy. Ostatní biochemické charakteristiky nového kmene se neliší od rodičovského kmene.

Nový kmen je uložen v Čs. sbírce mikroorganismů (Czechoslovak Collection of Microorganismus), Univerzita J. E. Purkyně, Brno, tř. Obránců míru 10, pod označením *Pseudomonas* sp. CCM 3 987.

Množství této specifické hydrolázy v buňkách bylo kvantitativně určováno měření počáteční rychlosti hydrolýzy glutaryl-7-ACK v prostředí 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,0 a teplotě 37 °C v oblasti enzymové kinetiky nultého řádu. Produkty reakce byly stanoveny spektrofotometricky za použití p-dimethylaminobenzaldehydu (Balasingham a sp., Biochim. Biophys. Acta 276, 250, 1972). Jedna jednotka (U) enzymové účinnosti hydrolázy glutaryl-7-ACK je takové množství enzymu, které odpovídá tvorbě jednoho mikromolu (1 μ m) 7-ACK za minutu za výše uvedených podmínek reakce. Specifická aktivita je definována jako U $\cdot$ g⁻¹ suché hmoty buněk. Pro chromatografii byla použita tenká vrstva celulózy a systém n-propanol-voda (7:3) s ninhydrinovou detekcí (R_f 0,5) se semikvantitativním vyhodnocením na densitometru Vitatron TLD 100. Obsah účinné látky v produktu byl ověřen vysokotlakou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Předmětný kmen *Pseudomonas* sp. CCM 3 987 je použitelný pro enzymovou hydrolýzu glutaryl-7-ACK připravenou buď chemicky (chemickou syntézou) nebo enzymově (oxidací cefalosporinu C oxidázou D-aminokyselin). S výhodou lze předmětný vysokoprodukční kmen využít jako výchozí zdroj pro výrobu imobilizovaných biokatalyzátorů a to jak na bázi imobilizovaných buněk, tak pro izolaci a následnou imobilizaci této specifické hydrolázy. Předmětný kmen lze rovněž využít pro další genovou manipulaci s cílem multiplikace strukturálních genů nesoucích informaci pro syntézu tohoto enzymu.

Výhodou využití nového kmene *Pseudomonas* sp. CCM 3 987 ke podstatně vyšší specifické aktivitě hydrolázy glutaryl-7-ACK v průměru o 150 % ve srovnání s rodičovským kmenem. Biosyntéza tohoto enzymu u předmětného nového vysokoprodukčního kmene se na konci kultivace pohybuje v rozmezí 220 až 270 U $\cdot$ liter⁻¹ kultivační kapaliny a specifická aktivita buněk dosahuje 50 až 75 U $\cdot$ g⁻¹ suché hmoty buněk.

Tyto výhodné vlastnosti nového kmene umožňují zkrácení doby během hydrolýzy oxidovaných forem cefalosporinu C, zejména glutaryl-7-ACK, čímž se sníží celkové množství nežádoucích vedlejších produktů.

Dále je v genealogickém schématu uvedeno kvalitativní a kvantitativní srovnání vlastností kmene mikroorganismu s aktivitou hydrolázy glutaryl-7-ACK.

Charakteristika	Přírodní izolát kmene <i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas</i> sp. CCM 3 635	<i>Pseudomonas</i> sp. CCM 3 987
Přítomnost beta-laktamáz	+	-	-
Indukce syntézy enzymu glutarovou kyselinou	+	-	-
Specifická aktivita U $\cdot$ g ⁻¹ %	$\frac{12}{100}$	$\frac{25}{208,3}$	$\frac{50 \text{ až } 75}{417 \text{ až } 625}$

V následujících příkladech provedení je detailně popsán způsob získání nového vysoko-produkčního kmene mikroorganismu.

P ř í k l a d

Kmen mikroorganismu *Pseudomonas* sp. CCM 3 987 byl získán tímto postupem. Kulturou kmene *Pseudomonas* sp. CCM 3 635 vyrostlou na šikmém masopeptonovém agaru bylo očkováno 100 ml tekuté živné půdy v 500 ml varných baňkách následujícího složení: 1 % pepton, 0,5 % hovězí extrakt, 0,1 % kvasničný extrakt, 0,5 % chlorid sodný. Baňky byly inkubovány na rotačním třepacím stroji o frekvenci 240 otáček $\cdot \text{min}^{-1}$ při teplotě 28 °C po dobu 24 hodin.

5 ml této kultury první vegetativní generace inokula bylo použito pro očkování živné půdy stejného složení při stejném plnění baňek a provedena kultivace za jinak stejných podmínek. Kultura druhé vegetativní generace byla ve druhé třetině exponenciální fáze růstu buněk asepticky odstředěna a supernatant slit. Separované buňky (sediment) byly za aseptických podmínek promyty sterilním 0,1 M fosfátovým pufrem o pH 7,0 a suspendovány do stejného objemu téhož pufru. Připravená suspenze buněk byla poté přidána k roztoku N-metyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidinu ve stejném pufru tak, aby výsledná směs obsahovala cca 10^7 až 10^8 buněk $\cdot \text{ml}^{-1}$ a 150 μg uvedeného mutagenu $\cdot \text{ml}^{-1}$.

Směs byla míchána 60 minut při teplotě místnosti a poté byla vyseta na Petriho misky obsahující pevnou živnou půdu s masopeptonovým agarem. Po třídní inkubaci při 28 °C byly vyrostlé kolonie pomocí sametových razidel přeneseny na pevnou půdu na Petriho misky obsahující 0,5 % bílkovinného hydrolyzátu (komerční výrobek Vitana), 0,5 % kvasničného extraktu, 0,1 % kukuřičného extraktu a 0,3 % p-nitroanilidu glutarové kyseliny (sterilizace této látky filtrací přes sterilní Seitz filtr) a 2 % agaru.

Po 14denní inkubaci při 28 °C byl proveden výběr monokloniových izolátů (klonů), jehož princip spočívá v tom, že kolonie, které byly nejmenší, byly vyočkovány na masopeptonové šikmé agary.

Poté byly jednotlivé izoláty, po jejich submersní kultivaci v baňkách prováděné výše uvedeným způsobem a v tekuté živné půdě obsahující 1 % peptonu a 25% filtrátu roztoku 4 % kukuřičného extraktu (který byl předem předsrážen za varu při pH 7,6), opět výše popsáním způsobem mutagenizovány pomocí stejného chemického mutagenu.

Suspenze po mutagenезi byla vyseta na pevnou neselektivní masopeptonovou živnou půdu v Petriho miskách a provedena pasivní selekce monokloniových izolátů, které byly testovány submersní jednorázovou kultivací v baňkách následujícím způsobem.

500 ml varné baňky byly naplněny 100 ml tekuté živné půdy dříve uvedeného složení (obsahující pepton a předsrážený kukuřičný extrakt), do které byly očkovány monokloniové izoláty ze šikmých masopeptonových agarů, které byly získány dvojitou mutagenézí a cílenou a pasivní selekcí. Baňky byly inkubovány na rotačním třepacím stroji způsobem a za podmínek uvedených dříve po dobu 24 hodin.

Po uvedené době bylo 5 ml kultury takto připravené první vegetativní generace použito pro inokulaci 100 ml tekuté živné půdy v 500 ml varných baňkách, jejíž složení bylo: 5 % bílkovinného hydrolyzátu (komerční výrobek Vitana) a 50 ml filtrátu roztoku 4 % kukuřičného extraktu předsráženého předem za varu při pH 7,6. Druhá vegetativní generace kultur byla kultivována za jinak stejných podmínek po dobu 42 hodin. Poté byly kultury separovány odstředěním (16 000 G 10 minut), supernatant slit, buněčný sediment promyt stejným objemem 0,1 M fosfátovým pufrem o pH 7,0 a připraveny standardní suspenze buněk v téže pufru obsahující 8 mg suché hmoty buněk $\cdot \text{ml}^{-1}$. Tyto suspenze byly dále hodnoceny na specifickou enzymovou aktivitu hydrolázy glutaryl-7-ACK ve srovnání s kontrolní suspenzí buněk rodičovského kmene, které rovněž vyrostly za stejných kultivačních podmínek, přičemž reakční podmínky stanovení jsou uvedeny v popisu předmětného vynálezu.

Ze série zkoumaných monokloniových izolátů (klonů), které byly podrobeny kvantitativní

enzymové analýze popsaným způsobem vyplynulo, že pouze jeden z nich dosahuje specifické aktivity v rozmezí 50 až 75 U . g⁻¹, což jest o 100 až 200 % vyšší specifická aktivita ve srovnání s rodičovským kmenem.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Kmen mikroorganismu *Pseudomonas species* CCM 3 987 s vysokou produkcí hydrolázy 7-beta-(4-karboxybutanamido)cefalosporánové kyseliny.