



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

203352

(11)

(81)

/22/ Prihlášené 27 01 78
/21/ /PV 569-78/

(51) Int. Cl.³
C 12 P 35/00

(40) Zverejnené 30 05 80

(45) Vydané 15 10 82

(75)

Autor vynálezu

LUCINOVÁ EVA ing., BANSKÁ BYSTRICA, FRIMM RICHARD doc. ing. CSc.,
BRATISLAVA, WELWARD LADISLAV ing. CSc., BANSKÁ BYSTRICA
a KOŠALKO RUDOLF ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob úpravy fermentačnej pôdy

1.

Vynález sa týka spôsobu úpravy fermentačnej pôdy pred izoláciou cefalosporínu C, na syntetických živiciach.

Získanie cefalosporínu C čistením fermentačnej pôdy naväzuje na jeho fermentačnú prípravu pomocou mikroorganizmov rodu *Cephalosporium*, napr. kmeňom *Cephalosporium acremonium* ATCC 14 553, pričom médium obsahuje biologicky aktívnu látku /Crawford K. a kol.: Antibiotics production by a species of *Cephalosporium*. J. Gen. Microbiol. 6 /1952/, str. 47-59; Hewitt W. L.: The cephalosporins. The Journal of infections Diseases 128, /1973/. str. 312.

Takéto fermentačné postupy sa uvádzajú tiež napr. vo švajčiarskych patentoch č. 570 460, č. 565 246, č. 570 459, v britských patentoch č. 820 422, v US patente č. 3 082 155 a v patente NSR č. 1 492 053. V týchto patentoch sa uvádzajú tiež určité postupy na získanie a čistenie cefalosporínu C zo surovej fermentačnej pôdy.

Spôsoby čistenia cefalosporínu C z fermentačnej pôdy cez N-deriváty, napríklad N-haloalkanoyl, alebo N-benzoyl, extrahujúce sa vhodnými organickými rozpúšťadlami sú popísané v US pat. č. 3 739 002, č. 3 835 129, v pat. NSR č. 2 255 973, č. 2 157 693 a v pat. ZSSR číslo 282 174.

Významnou skupinou izolačných postupov sú spôsoby založené na delení pomocou syntetických ionexov, napr. franc. pat. č. 1 353 113, brit pat. č. 1 210 823, č. 1 036 125, resp. austrálsky pat. č. 251 922, 455 753, švéd. pat. č. 198 707, 215 561, 198 707, 541 579.

Hydrofilné antibiotiká, napr. cefalosporín C, sa môžu zo zložitých suspenzných fermentačných pôd obsahujúcich veľké množstvo rozpustených organických a anorganických zlúčenín získať pomocou makroporéznych neionogenných sorbentov, napr. typu Amberlit XAD-2, Ostion SP-1, Diaion HP-20.

Izolácie pomocou týchto sorbentov sú uvádzané napr. v US pat. č. 3 725 400, resp. ZSSR pat. č. 350 265.

Podmienkou zdarného priebehu izolácie na živiciach je predpoklad mať k dispozícii číry

filtrát, ktorý slúži ako nástrek na hlavu kolon. Pri čistení cefalosporínu C sa pomocou anorganických kyselín upravuje pH na 2,7, čím sa má vyvolať koagulácia bielkovín.

Po filtrácii v priebehu adsorpcie dochádza však k postupnému ďalšiemu koagulovaniu niektorých rozpustných látok, hlavne bielkovín, pričom takto znečistený filtrát znižuje kapacitu sorbentov a sťažuje ďalší priebeh izolačného postupu včítane regenerácie sorbentov.

Hore uvedená nedostatky odstraňuje spôsob úpravy fermentačnej pôdy, ktorého podstata spočíva v tom, že k fermentačnej pôde po biosyntéze cefalosporínu C sa pridá pri pH 2,5-4,0 5 až 30 mg/ml močoviny, pôda sa sfiltruje a podrobí ďalšej purifikácii. Postup sa môže doplniť ešte prídavkom 0,5 až 5% anionaktívneho detergentu.

O močovine je známe, že môže u niektorých labilných nekovalentných väzieb rušiť terciálnu štruktúru bielkovín a tým spôsobiť ich denaturáciu.

Tento denaturačný efekt je veľmi potrebný, pretože pre malú termostabilitu cefalosporín C nie je reálna termokoagulácia surovej fermentačnej pôdy.

Prídavok tejto látky spôsobuje zníženie obsahu rozpustených proteínov v získanom filtráte, čo v konečnom efekte zlepšuje adsorpčnú kapacitu a tiež regeneráciu použitých živíc.

Anionaktívne detergenty okrem čistiaceho účinku pôsobia aj ako antibakteriálne látky, čo je veľmi dôležité ako prevencia pred možnou mikrobiálnou kontamináciou náplní stĺpcov.

V tejto skupine detergentov tvoria veľkú skupinu prídavky, ktorých hlavným podielom je laurylsulfát sodný. Komerčne sa osvedčil najmä TERGITOL.

V ďalšom je vynález bližšie objasnený v príkladoch postupov bez toho, že by sa na tieto akokoľvek obmedzoval.

P r í k l a d 1

Surová fermentačná pôda sa upraví 10 mg močoviny na 1 ml pôdy, 15 minút mieša a potom okyseli s kyselinou sírovou zriedenou v pomere 1:4 na pH 2,5. Biomasa a ďalšie nerozpustné zložky sa filtráciou oddelia od hnedo sfarbeného číreho filtrátu, obsahujúceho 3 600 µg/ml cefalosporínu C.

6 000 ml tohoto filtrátu sa perkuluje cez 3 970 ml náplne živice Ostion SP-1 pri mernom zatažení 1 h⁻¹. Zbytok adsorbátu z náplne sa vytlesní 2 000 ml vody a neviazaný cefalosporín C desorbujeme 15%-ným vodným roztokom acetónu.

Získa sa 3 060 ml eluátu s obsahom 5 000 µg/ml cefalosporínu C, ktorý sa podrobí ďalšej purifikácii.

Použitý Ostion SP-1 sa regeneruje 12 l 25%-ného vodného roztoku acetónu s obsahom 2% NaOH. Potom sa náplň premyje 2 l 1%-nej kyseliny sírovej a nakoniec 12 l vody.

P r í k l a d 2

Spôsob ako v príklade 1, s tým rozdielom, že k surovej fermentačnej pôde sa pridá 5 mg močoviny na 1 ml pôdy a cefalosporín C sa zo živice eluuje 0,05 N vodným roztokom NaOH. Na 4 000 ml Ostionu SP-1 sa adsorbuje 5 450 ml číreho filtrátu obsahujúceho 3 100 µg/ml cefalosporínu C. Tento sa desorbuje zo sorbentu 0,05 N vodným roztokom NaOH, pričom v 3 800 ml eluátových podieloch sa získa 82 % z celkového množstva cefalosporínu C.

P r í k l a d 3

Spôsob ako v príklade 1, s tým rozdielom, že k surovej fermentačnej pôde sa pridá 30 mg močoviny na 1 ml pôdy a pH sa upraví s kyselinou sírovou na 2,9 /1:4/. Získaný číry filtrát sa podrobí ďalšej purifikácii na Ostione SP-1.

P r í k l a d 4

Spôsob ako v príklade 1, len s tým rozdielom, že k surovej fermentačnej pôde sa pridá 10 mg močoviny na 1 ml pôdy a 0,5 promile anionaktívneho detergentu Tergitolu. Takto upravená surová fermentačná pôda sa sfiltruje a číry filtrát podrobí ďalšej purifikácii.

P r í k l a d 5

Spôsob ako v príklade 1, s tým rozdielom, že k surovej fermentačnej pôde sa pridá 5 mg/ml močoviny a 5 promile anionaktívneho detergentu Tergitolu a pH sa upraví na 4,0 s kyselinou sírovou /1:4/. Takto upravená fermentačná pôda sa sfiltruje a filtrát podrobí ďalšej purifikácii.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Spôsob úpravy fermentačnej pôdy po biosyntéze cefalosporínu C, vyznačujúci sa tým, že k pôde sa pridá, pri pH 2,5 - 4,0, 5 - 30 mg/ml močoviny, pôda sa sfiltruje a podrobí ďalšej purifikácii.

2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačený tým, že do fermentačnej pôdy sa ešte prípadne pridá 0,5 - 5 % anionaktívneho detergentu.