



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

212187

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 12 12 80
(21) (PV 8780-80)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 37/00

(40) Zveřejněno 31 07 81

(45) Vydáno 15 02 84

(75)
Autor vynálezu

MATELOVÁ VLASTA dr., ROZTOKY u PRAHY, CHROMÍK JINDŘICH ing., ULBERT
STANISLAV ing., ČULÍK KAREL dr., PRAHA

(54) Způsob výroby penicilinů

Vynález se týká použití vodného eluátu z rostlinných dusíkatých substrátů, zejména sojové nebo arašídové nebo bavlníkové mouky nebo z globulárního proteinu z bavlníkových semen jako zdroje asimilovatelného dusíku v živné půdě při fermentační výrobě penicilinů.

Vynález se týká způsobu výroby penicilinů, tj. penicilinu G a V, kultivací produkčního mikroorganismu v tekuté živné půdě, obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli a prekursory, za submersních podmínek.

Jak je známo, jedním z hlavních faktorů, který ovlivňuje výtěžnost fermentačního procesu při biosyntetické výrobě penicilinu, je složení živné půdy, jejíž nedílnou součástí je zdroj asimilovatelného dusíku. Na jeho vhodnosti závisí výtěžnost fermentačního postupu a na jeho dostupnosti a ceně pak závisí do značné míry ekonomie výroby.

Zdrojem dusíku, jeho vhodností a použitým množstvím lze ovlivnit fermentační proces. Při velkovýrobě penicilinu jsou jako zdroj dusíku zpravidla používány různé rostlinné substráty, např. rozemletá semena sóji, arašídů, bavlníku nebo s největším úspěchem je používána Pharmamedia, což je prodejní název nehydrolyzovaného globulárního proteinu získaného z bavlníkových semen. Tuto surovinu však není z ekonomických důvodů možné používat pro výrobu. Byly proto hledány cesty, jak upravit dostupné suroviny, aby svou kvalitou se vyrovnaly Pharmamedii.

Byly provedeny následující úpravy rozemletých semen sóji, arašídů, bavlníku: kyselá hydrolyza, alkalická hydrolyza, enzymatická hydrolyza a eluce.

Kyselá hydrolyza substrátů po úpravě koncentrovanou kyselinou solnou probíhá různou dobu od 10 minut do 120 minut za zvýšeného tlaku.

Alkalická hydrolyza substrátu hydroxidem sodným probíhala 60 až 120 minut za varu.

Při enzymatické hydrolyze substrátu byla měněna koncentrace substrátu (od 10 do 30 %), druh enzymu (pankreatin, proteáza, papain), koncentrace enzymu (1000 až 30 000 j./g substrátu), doba hydrolyzy (1 až 48 hodin).

Eluce byla provedena při různé koncentraci substrátu (2 až 9 %), různém pH (2 až 10), byla aplikována různá doba eluce (0 až 3 hodiny), pro eluci byla zvolena různá teplota (laboratorní až 100 °C), eluáty byly různě upravovány (filtrace nebo bez filtrace), získané eluáty pro přípravu fermentačních půd byly ředěny do různých stupňů nebo nebyly ředěny vůbec.

Z uvedených úprav, které byly provedeny s rostlinnými zdroji dusíku, se neosvědčila kyselá ani alkalická hydrolyza, štěpení bílkovin proběhlo až na volné aminokyseliny a takováto forma zdroje dusíku je pro biosyntézu penicilinu nevhodná. Enzymatickou úpravou substrátů byly získány hydrolyzáty, se kterými bylo dosaženo při fermentaci 90% výtěžku ve srovnání s produkcemi dosaženými s Pharmamedii.

Z výsledků hodnocení všech alternativ úprav zdrojů dusíku vyplynulo, že nejvhodnější je postup, při kterém je substrát pouze eluován. S eluáty připravenými nejvhodnějšími postupy byly získány výtěžky ve fermentaci vyšší o 10 až 15 % proti kontrole provedené s Pharmamedii. Bylo zjištěno, že všechny substráty dusíku upravené vhodným elučním postupem skýtají vyšší výtěžky při fermentaci než bez úpravy včetně Pharmamedie. Z dostupných surovin je nejvhodnějším materiálem pro eluci arašídová mouka, absolutně nejlepší je Pharmamedia.

Koncentrace substrátů pro eluci závisí na dalším zpracování eluátu a na fermentačním postupu. Nejvhodnější pH k eluci je 9,0 doba potřebná k eluci se řídí teplotou, je-li zvolena vyšší teplota, je čas potřebný k eluci kratší. Vysvětlení pro zvýhodnění substrátů po eluci při zvýšeném pH pravděpodobně spočívá v docílení dostupnosti důležitých aminokyselin, zejména valinu a methioninu, jak bylo prokázáno celkovou analýzou eluátů.

Příklady provedení:

P ř í k l a d 1

Fermentace v laboratorním měřítku byla provedena kultivací produkčního mikroorganismu ve varných baňkách obsahu 500 ml se 40 ml fermentační půdy na rotačním třepacím stroji. Půda obsahovala jako zdroj uhlíku sacharózu, která byla průběžně dávkována, zdrojem dusíku byly látky rostlinného původu jako takové v koncentraci 6 % nebo eluáty z nich připravené. Eluce byla provedena následujícím postupem: 9 % arašídové nebo sojové mouky nebo Pharmamedie (ad) je suspendováno ve vodě, následuje úprava pH 50% roztokem hydroxidu sodného na hodnotu 9,0, takto upravená suspenze je zahřáta na teplotu 70 až 80 °C, tato teplota je udržována v průběhu 60 minut.

Takto připravený eluát je zfiltrován přes gázu a pro přípravu fermentačních půd je zředěn v poměru 75:25 dílům vodou. Tímto způsobem připravený eluát obsahuje rozpustného dusíku 4,0 až 4,5 mg/ml, celkového dusíku 4,5 až 5,0 mg/ml a amoniakálního dusíku kolem 0,5 g/ml. Půda dále obsahovala jako zdroj síry sirnatan sodný, kyselinu fenoxycetovou jako prekursor pro biosyntézu penicilinu V a jako živnou sůl uhlíčitan vápenatý. Po sterilizaci byla hodnota pH vyšší než 7. Inokulace byla provedena 10 % vegetativního inokula produkčního kmene *Penicillium chrysogenum*, teplota při kultivaci byla 25 °C, doba fermentace 10 dnů. S uvedenými zdroji dusíku bylo dosaženo následujících produkcí.

Zdroj dusíku	Penicilin j./ml
sojová mouka	20 900
arašídová mouka	19 500
Pharmamedia	22 300
eluát sojové mouky	24 000
eluát arašídové mouky	24 500
elutá Pharmamedie	25 000

P ř í k l a d 2

Fermentace v laboratorním měřítku byla provedena shodným postupem jako u příkladu 1 s tím rozdílem, že zdrojem uhlíku byl sojový olej a laktóza, celkové množství obou látek bylo v půdě od počátku, zdrojem dusíku byly shodné suroviny jako v příkladě 1, navíc bavlníková mouka, v koncentracích sojová nebo arašídová mouka 3,38 %, bavlníková mouka 4,5 %, Pharmamedia 2,5 %, jejich eluce byla provedena následujícím postupem: 3,38 % arašídové mouky, sojové mouky nebo Pharmamedie, nebo 4,25 % bavlníkové mouky je suspendováno (ad) ve vodě, následuje úprava pH 50% hydroxidem sodným na hodnotu 9,0, takto upravené suspenze jsou ponechány při teplotě 25 až 40 °C 60 minut nebo při teplotě 40 až 90 °C 15 minut.

Takto připravené eluáty obsahují 2,5 až 3,0 mg/ml rozpustného dusíku, 3,0 až 3,5 mg/ml celkového dusíku a kolem 0,2 mg/ml amoniakálního dusíku. Půda dále obsahuje jako další zdroj dusíku síran amonný, zdrojem síry je síran sodný. Ostatní složky půdy jsou shodné s půdou uvedenou u příkladu 1. Půdy po sterilizaci mají pH kolem 7,0. Inokulace je provedena 5 % vegetativního inokula produkčního kmene *Penicillium chrysogenum*, teplota při kultivaci je 25 °C, doba fermentace 9 dnů. S uvedenými zdroji dusíku bylo dosaženo následujících produkcí.

Zdroj dusíku	Penicilin j./ml
sójové mouka	25 500
arašídová mouka	27 000
bavlníková mouka	27 500
Pharmamedia	28 000
eluát sójové mouky	26 000
eluát arašídové mouky	31 500
eluát bavlníkové mouky	29 000
eluát Pharmamedie	33 200

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob výroby penicilinů kultivací produkčního mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* v tekuté živné půdě, obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli a prekursory, za submerzních podmínek, vyznačující se tím, že se jako zdroje asimilovatelného dusíku používá roztoku získaného elucí rostlinných dusíkatých substrátů, zejména sójové nebo arašídové nebo bavlníkové mouky nebo globulárního proteinu z bavlníkových semen, vodou při pH 8 až 10, s výhodou 9, při teplotě 20 °C až k teplotě varu, přičemž hmotnostní množství výchozího substrátu činí 2 až 10 %.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se používá eluátu filtrovaného.