

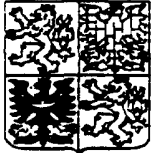
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

281 698

ČESKÁ
REPUBLIKA

(19)



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (21) Číslo přihlášky: **366-94**
(22) Přihlášeno: 08. 08. 92
(30) Právo přednosti:
21. 08. 91 DE 91/4127648
(40) Zveřejněno: 13. 07. 94
(47) Uděleno: 15. 10. 96
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 11. 12. 96

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 P 35/06

// (C 12 P 35/06, C 12 R 1:75)

- (73) Majitel patentu:
HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT,
Frankfurt am Main, DE;
- (72) Původce vynálezu:
Bayer Thomas, Bad Soden am Taunus, DE;
Schramm Wilhelm, Kelkheim, DE;
Rathscheck Wolfgang, Bad Soden am
Taunus, DE;

(54) Název vynálezu:
**Způsob výroby cefalosporinu C
fermentací Acremonium chrysogenum**

(57) Anotace:
Vynález se týká výroby cefalosporinu C fermentací Acremonium chrysogenum při teplotě 20 až 30 °C a hodnotě pH 5 až 8, spočívající v tom, že se fermentační roztok v průběhu fermentace filtruje přes filtrační systém s příčným tokem, přičemž odebrané množství filtrátu může být ve fermentoru nahrazeno.

CZ 281 698 B6

Způsob výroby cefalosporinu C fermentací *Acremonium chrysogenum*

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby cefalosporinu C fermentací *Acremonium chrysogenum*.

Dosavadní stav techniky

Zpracování kultivačního prostředí obsahujícího antibiotika se zpravidla provádí až po dosažení maximálního obsahu antibiotik v kultivačním prostředí. Většinou se jako první zpracovatelský stupeň provádí oddělení buněk a pevného podílu filtrací nebo odstředěním. Potom se provádí obohacení kapalného podílu kultivačního prostředí látkou nebo látkami, která, popřípadě které jsou cílem kultivačního procesu, přičemž toto obohacení se provádí extrakcí nebo adsorpcí. Takto vyčistěný produkt se potom zpravidla ponechá vykrytalizovat, potom se dále zpracuje na polosyntetická antibiotika.

Při této metodě zpracování zahrnující několik následných zpracovatelských stupňů se nevhodně uplatňuje nestabilita molekul mnoha antibiotik, například cefalosporinu C. Již v průběhu vlastní fermentace dochází k odbourávání cefalosporinu C. K tomuto odbourávání může docházet jak čistě chemicky, a to napadením beta-laktamového kruhu vodou, tak i enzymaticky, například účinkem esteráz (Konecny a kol., 1973, J. of Antib., 26, 3, 135 až 141). Dále se při fermentaci tvoří celá řada vedlejších produktů, jakými jsou deacetoxycefalosporin C a deacetylcefalosporin C, které musí být v průběhu čištění cefalosporinu C odděleny. To má za následek značné snížení výtěžku cefalosporinu C.

Filtrační systémy s příčným tokem (filtrační systémy "cross-flow") s polymerními nebo keramickými membránami již byly pro zpracování kultivačních prostředí s obsahem antibiotik použity (Harris a kol., J. Chem. Techn. Biotechnol., 1988, 42, 19 až 30). Až dosud však nebylo zjištěno, že při tomto způsobu může být omezen rozklad cefalosporinu C.

Úkolem tohoto vynálezu je najít způsob, při kterém by byl omezen rozklad cefalosporinu C a zmenšena tvorba vedlejších produktů a kterým by mohlo být dosaženo zvýšení výtěžku cefalosporinu C, vztaženého na množství použitého substrátu.

S překvapením bylo nyní zjištěno, že použitím filtračního modulu s příčným tokem v průběhu fermentace *Acremonium chrysogenum* se zvýší výtěžek cefalosporinu C, omezí se tvorba deacetylcefalosporinu C a může být prodloužena produkční doba. Touto filtrací a malou tvorbou deacetylcefalosporinu C se také výrazně zjednoduší zpracování cefalosporinu C.

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je způsob výroby cefalosporinu C fermentací *Acremonium chrysogenum* při teplotě 20 až 30 °C a hodnotě pH 5 až 8, jehož podstata spočívá v tom, že se fermentační roztok v průběhu fermentace filtruje přes filtrační systém s příčným

tokem, přičemž odebrané množství filtrátu může být ve fermentoru nahrazeno. Výhodně se v rámci filtračního systému s příčným tokem použije polymerní nebo keramický filtr. Výhodně má filtr velikost pórů mezi 4 a 200 nm. Výhodně činí přetoková rychlost přes filtrační plochu 1 až 10 m/s. Výhodně se filtrát ve fermentoru nahradí vodou. Filtrát může být také výhodně nahrazen živným roztokem nebo může být filtrát po oddělení požadovaného produktu zaveden zpět do fermentoru.

Živný roztok obsahuje zdroje uhlíku, jakými jsou sacharóza, kukuřičný škrob, dextróza nebo melasa, a zdroje dusíku, jakými jsou sójová moučka, podzemnicová moučka, sladový extrakt nebo octan amonný.

Živné prostředí obsahuje také anorganické soli, jako hydrogenufosforečnan sodný, chlorid sodný, chlorid vápenatý, síran vápenatý, uhličitán vápenatý, síran hořečnatý nebo hydrogenufosforečnan draselný. Dále může být k živnému prostředí přidán také tuk, například methylester kyseliny olejové nebo sójový olej. Kromě toho mohou být přidány také stopové prvky, jako soli železa, manganu, mědi, zinku, kobaltu nebo soli dalších kovů.

Kultivace *Acremonium chrysogenum* (*Cephalosporium acremonium*), výhodně DSM 6473 se provádí při teplotě 20 až 30 °C, výhodně při teplotě 25 °C, a při hodnotě pH mezi 5 a 8, výhodně při hodnotě pH rovné 7. Tato kultivace se nejdříve provádí aerobně v třepací baňce a potom ve fermentoru za míchání a provzdušňování vzduchem nebo čistým kyslíkem. Kultivace mikroorganismů ve fermentoru se provádí po dobu 120 až 240 hodin, výhodně po dobu 130 až 170 hodin.

Jako filtrační systémy s příčným tokem mohou být použity polymerní, uhlovodíkové nebo keramické moduly tvořené membránami z destiček, trubiček, kapilár, svitků nebo dutých vláken a mající separační práh odpovídající separačnímu prahu ultrafiltrace až sterilizační filtrace. Výhodně se použijí filtrační moduly s velikostí pórů od 4 nm do 0,2 μm. Jako materiály pro výrobu těchto membrán mohou být použity polysulfony, polyamidy, acetát celulózy, oxid hlinitý nebo oxid zirkoničitý. Filtrace se může provádět kontinuálně nebo diskontinuálně. S filtrací se započne asi 2 až 3 dny po zaočkování fermentoru a může v ní být pokračováno až do konce fermentačního procesu. Průtoková rychlost fermentačního roztoku skrze filtrační plochu činí 0,5 až 20 m/s, výhodně 1 až 10 m/s.

Filtrát, který se v průběhu fermentace z fermentoru odtahuje může být nahrazen odpovídajícím množstvím kapaliny nebo může být tento filtrát po oddělení požadovaného produktu, například absorpcí, vrácen zpět do fermentoru. K tomu může být přičerpána voda obohacená odpovídajícími solemi nebo dalšími složkami živného prostředí.

Objem kapaliny, který nepermeoval skrze membránu, se také zavede zpět do fermentoru.

Fermentor a filtrační systém s příčným tokem jsou spojeny odpovídajícími trubkami nebo hadicemi, které byly ještě před vlastní fermentací sterilizovány. Pro fermentor o obsahu 100 l je

zapotřebí asi 0,2 m² filtrační plochy. Mohou být však použity i větší a menší filtrační plochy.

V následující části popisu bude vynález blíže objasněn pomocí příkladů jeho konkrétního provedení, které však mají pouze ilustrační charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen formulací patentových nároků.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Fermentace *Acremonium chrysogenum* DSM 6473

Tato fermentace se provádí v následujícím živném roztoku:

Předkultivační prostředí	g/l
Kukuřičný výluh	11,75
Octan amonný	4,5
Sacharóza	20,0
Dihydrát síranu vápenatého	0,5
Heptahydrát síranu hořečnatého	0,5
pH 7,0 (nastaveno 15 % (hmotn.) NaOH)	

Fermentační prostředí	g/l
Tuku=prostá podzemnicová moučka	100,0
Octan amonný	6,0
Monohydrát glukózy	5,0
Methyloleát	5,0
D,L-Methionin	3,0
Dihydrát síranu vápenatého	5,0
Heptahydrát síranu hořečnatého	5,0
Uhličitan vápenatý	5,0
Odpěňovadlo	0,5

Roztok k doplnění fermentačního prostředí

Monohydrát glukózy	500,0
D,L-Methionin	24,75.

K zaočkování 100 ml předkultivačního prostředí se použijí kultury šikmého agaru (třepací baňka o obsahu 500 ml se 4 šikanami). Tyto baňky se po dobu 48 hodin inkubují při 150 otáčkách za minutu a teplotě 25 až 28 °C. Tyto kultury se potom použijí k zaočkování dalšího předkultivačního prostředí (1 000 ml prostředí v baňce o obsahu 5 000 ml se inkubuje při 120 otáčkách za minutu a teplotě 25 až 28 °C po dobu 58 až 60 hodin). Uvedeným druhým předkultivačním prostředím se v míchaném fermentoru zaočkuje 60 litrů fermentačního prostředí. Tato fermentace se provádí při

teplotě 25 °C. Provzdušňování se reguluje tak, že pO_2 ve fermentačním živném prostředí je vyšší než 20 %.

Po 74 hodinách započne filtrace přes keramický modul s příčným tokem (komerčně dostupný u firmy Membraflow, alfa- Al_2O_3) mající filtrační plochu 0,2 m² a velikost pórů 0,2 μm. Tato filtrace se provádí za následujících provozních podmínek:

přetoková rychlost:	2 m/s,
přečerpávací rychlost:	1 500 l/h,
filtrační výkon:	2 l/h a
filtrační doba:	68 h

V následující tabulce jsou uvedeny výsledky pokusu po 142 hodinách fermentace bez filtrace s příčným tokem (A) a za použití filtrace s příčným tokem (B).

Tabulka 1

	Cefalospo- sporin (%)	Deacetyl- cefalo- sporin/ cefalo- sporin (%)	Produktivita cefalo- sporinu		Produktivita deacetylcefa- losporinu
			Max. (%)	Po 6 dnech (%)	Po 6 dnech (%)
A	100	100	100	100	100
B	140	44	200	400	53

Příklad 2

Fermentace se provádí stejně jako v příkladu 1. V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky po 167 hodinách fermentace s použitím filtrace s příčným tokem (B) ve srovnání s paralelní fermentací bez filtrace, která byla ukončena po 142 hodinách.

Tabulka 2

	Cefalosporin (%)	Deacetylcefalosporin/ cefalosporin (%)
A (142 hodin)	100	100
B (167 hodin)	129	69

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob výroby cefalosporinu C fermentací *Acremonium chrysogenum* při teplotě 20 až 30 °C a hodnotě pH 5 až 8, v y z n a č e n ý t í m, že se fermentační roztok v průběhu fermentace filtruje přes filtrační systém s příčným tokem, přičemž odebrané množství filtrátu může být ve fermentoru nahrazeno.
2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č e n ý t í m, že se v rámci filtračního systému s příčným tokem použije polymerní nebo keramický filtr.
3. Způsob podle nároků 1 nebo 2, v y z n a č e n ý t í m, že filtr má velikost pórů mezi 4 a 200 nm.
4. Způsob podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 3, v y z n a č e n ý t í m, že přetoková rychlost přes filtrační plochu činí 1 až 10 m/s.
5. Způsob podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 4, v y z n a č e n ý t í m, že filtrát se ve fermentoru nahradí vodou.
6. Způsob podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 4, v y z n a č e n ý t í m, že filtrát se nahradí živným roztokem.
7. Způsob podle jednoho nebo několika z nároků 1 až 4, v y z n a č e n ý t í m, že se filtrát po odstranění požadovaného produktu zavede zpět do fermentoru.

Konec dokumentu
