



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

251457
(11) (B3)

[51] Int. Cl.⁴
C 12 P 35/06

[61] Autorské osvedčenie je závislé
na autorskom osvedčení č. 231 458

[22] Prihlásené 17 10 83

[21] [PV 7599-83]

[40] Zverejnené 13 11 86

[45] Vydané 15 08 88

[75]

Autor vynálezu

KREMPOVÁ ALŽBETA ing., WELWARD LADISLAV ing. CSc.,
MICHÁLKOVÁ EVA ing. CSc., DUDEK MARCEL ing., BANSKÁ BYSTRICA,
MARTVOŇ AUGUSTÍN doc. ing. CSc., KOŠALKO RUDOLF ing. CSc.,
BRATISLAVA, CHROMÍK JINDŘICH ing. CSc., PRAHA,
FRIMM RICHARD doc. ing. CSc., BRATISLAVA

[54] Spôsob prípravy derivátov cefalosporínov

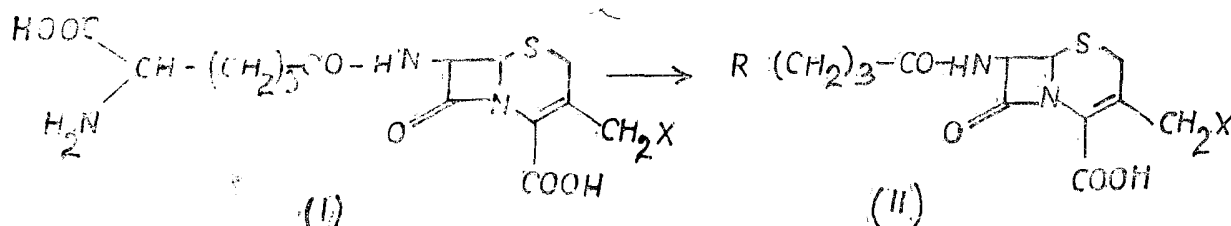
1

Vynález „Spôsob využitia imobilizovaných buniek pri príprave derivátov cefalosporínov“ sa týka spôsobu enzýmovej prípravy derivátov cefalosporínov (CFS) štruktúrneho vzorca II (viď rovnica č. 1), ktoré sú medziproduktami pri príprave kyseliny 7-

2

-aminocefalosporánovej (7-ACK) z látok štruktúrneho vzorca I pomocou imobilizovaných buniek mikroorganizmov obsahujúcich D-aminoacid deaminujúcu-O₂-reduktázu (D-aminoacidoxidázu, DAAO).

rovnica č. 1



kde

x = —O—CO—CH₃

x = —OH

x = —H

R = —COOH

cefalosporín C (CFS-C)

dezacetylcefalosporín C (DCFS-C)

dezacetoxycefalosporín C (DACFS-C)

Enzym D-aminoacidoxidáza produkovaný bunkami *Trigonopsis variabilis* CCY 15—1—2 je možné imobilizovať viacerými spôsobmi, pričom sa zvyšuje jeho stabilita a niekoľkonásobne sa predlžuje použiteľnosť pri súčasnom zjednodušení technológie a možnom využití nových technologických postupov.

Kyselinu 7-aminocefalosporánovú je možné pripraviť dvoma postupmi. Oba využívajú

ako substrát fermentačnou cestou získané cefalosporíny. Chemická konverzia je viacstupňový proces, náročný na čistotu používaných surovín a prísne dodržiavanie technologických operácií pri nízkych teplotách, pričom sa pracuje s toxickými látkami. Spôsob chemickej prípravy popisuje japonský patent č. 7 307 117, patent NSR č. 1 445 615 ai, lišiace sa od seba spôsobom blokovania karboxylovej a aminoskupiny a čs. AO 193 181. V porovnaní s chemickým spôsobom je enzýmová konverzia výhodnejšia z hľadiska menšej technologickej náročnosti, nie je požadovaný substrát vysokej čistoty a znižuje sa počet technologických operácií v procese. Enzýmová konverzia je nenáročná na surovinu. Jedná sa o jedno alebo dvojstupňový proces, pričom v dvojstupňovej reakcii vznikajú z látok štruktúrneho vzorca I látky štruktúrneho vzorca II, ktoré sú dostupným substrátom pre acylázy rôznych mikroorganizmov pri tvorbe 7-ACK. Japonský patent č. 74 044 695 uvádza možnosť priamej enzýmovej konverzie cefalosporínov na 7-ACK vo fermentačnej pôde pôsobením *Fusarium solani*, japonský patent č. 55 35 119/1980 opisuje rovnaký produkčný kmeň. Patent NSR 2 723 463 sa zaoberá priamou konverziou CFS na 7-ACK pôsobením enzýmov z kmeňov *Aspergillus* a *Alternaria* rovnako ako US patent č. 3 239 393 a japonský patent 53-94 093/1978, ktoré ako producentov uvádzajú kmene *Brevibacterium*, *Achromobacter* a *Flavobacterium*.

Výhodnejším spôsobom enzýmovej prípravy 7-ACK sa zatiaľ javí dvojstupňový proces, v ktorom účinkom enzýmu DAAO na cefalosporíny štruktúrneho vzorca I dochádza ku oxidačnej deaminácii bočného reťazca v polohe 7 na cefémovom jadre za vzniku látok štruktúrneho vzorca II. Japonský patent 54 154 592/1979 popisuje použitie buniek *Trigonopsis variabilis* zaistením glutaraldehydom, pričom dochádza ku zvýšeniu stability enzýmu a je možné použiť biologický materiál viackrát. Japonský patent č. 5 535 118/1980 popisuje rovnakého kmeňa na konverziu s účinnosťou 95 %. ČS AO č. 221 003 popisuje spôsob použitia aktivovaných buniek *Trigonopsis variabilis* s účinnosťou 80—85 percent. Aktivácia sa robí organickými rozpúšťadlami a detergentami. Brodelius v časopise *Applied Biochem. Biotechnology* 6/4/1981 str. 293—308 opisuje použitie buniek *Trigonopsis variabilis* zabudovaných do alginátového gélu pri produkcii α -ketokyselín z D-aminokyselín. V prípade použitia buniek na konverziu vo filtráte z fermentačnej pôdy, prípadne v eluáte, je doporučovaný prebýtok enzýmu podľa japonského patentu č. 507 158. AO 231 458 opisuje metódy imobilizácie buniek mikroorganizmov za použitia polyfunkčných činidiel.

Vynález „Spôsob využitia imobilizovaných buniek pri príprave derivátov cefalosporínov“ využíva imobilizované bunky kmeňa *Trigonopsis variabilis* CCY 15—1—2 pripra-

vené modifikovaným postupom podľa čs. AO č. 231 458. Imobilizovaný biokatalyzátor katalyzuje vznik derivátov cefalosporínov štruktúrneho vzorca II z látok štruktúrneho vzorca I. Látky štruktúrneho vzorca II sú medziproduktami pri príprave kyseliny 7-aminocefalosporánovej. Substrátom enzýmovej konverzie je vodný roztok sodnej soli cefalosporínu C alebo deproteinizovaný filtrát fermentačnej pôdy alebo eluáty z II. purifikačného stupňa z purifikácie CFS-ov o koncentrácii 3—5 % hmotnostných. Koncentrácia imobilizovaného biokatalyzátora pri reakcii je 10—15 % hmotnostných a koncentrácia inhibítorov vedľajších reakcií je 0,1 až 0,5 %. Reakcia prebieha 2—8 hodín pri teplote 32—36 °C za intenzívneho miešania a vzdušenia.

Biomasa produkčného kmeňa kvasinky *Trigonopsis variabilis* CCY 15—1—2 sa pripravuje dvojstupňovou kultiváciou, pričom každý stupeň trvá 72 h pri 28 °C za vzdušenia 1 : 1 (objem živnej pôdy : objem vzduchu za minútu). Do inokulačnej pôdy zložená 2 % kukuričného extraktu a 2 % glukózy sa ako stimulátor tvorby enzýmu pridáva 0,3 % D-valínu. pH pôdy pred sterilizáciou sa upraví na 5,0. Pre druhý stupeň fermentácie sa 8—10 % inokula očkuje fermentačná pôda zložená: glukóza 3 %, peptón 1 %, kvasničný extrakt 1 %, KH_2PO_4 0,1 %, MgSO_4 0,09 %, ktorá ako stimulátor obsahuje 0,25 percent D-metionínu. Biomasa z fermentačnej pôdy sa získava centrifugáciou pri otáčkach 4 000 min^{-1} počas 30 min za chladenia Bunky po 3-násobnom premytí 0,1M fosfátovým tlmivým roztokom pH 7,5 sa deponujú pri —25 °C. Takto ošetrované bunky si zachovávajú enzýmovú aktivitu 10—12 mesiacov.

Zosietené bunky *Trigonopsis variabilis* sa pripravujú pôsobením polyaldehydických činidiel na bunkovú suspenziu o koncentrácii 1 % polyaldehydu (glutaraldehydu) na bunkovú suspenziu so sušinou 10 %. Za stáleho miešania sa nechá pôsobiť 3—5 hodín pri laboratórnej teplote, potom sa centrifugáciou odseparuje biomasa, premyje sa vodou a deponuje pri —15 °C.

Agregáty buniek s enzýmovou aktivitou sa pripravujú z premytej biomasy pôsobením zmesi 1 % polyaldehydu (glutaraldehydu) a 2 % polyfunkčného činidla s obsahom amino- alebo iminoskupiny, napríklad polyetylénimín, tetrametyléndiamín, 3,3-diaminodipropylamín ai. Táto zmes sa pripraví 24 hodín pred použitím a intenzívne sa mieša bez prístupu vzduchu. Po pridaní agregáčnej zmesi k buncnej biomase sa táto zhomogenizuje a vymrazuje sa 6—10 hodín pri —25 °C.

Po rozmrazení sa vzniknuté agregáty odseparujú filtráciou alebo centrifugáciou, premyjú a deponujú pri +4 °C vo fosfátovom tlmivom roztoku pH 7,5.

Pri imobilizácii buniek na pevný nosič sa používajú porézne aluminosilikátové mate-

riály, minerálne nosiče na báze kremeliny, porézneho skla, keramické materiály, hliníky, makroretikulárne živice atď. materiály s vysokou adsorpčnou schopnosťou. Naviazanie buniek sa robí buď adsorpciou za rastu, kedy sa do kultivačného média pridá 10 % nosiča alebo naviazaním odseparovanej a premytej biomasy po ukončení fermentácie. V oboch prípadoch sa nosič s naviazanou biomasou premyje 5-krát vodou a pôsobením horeuvedenej zmesi polyfunkčných činidiel sa pripraví enzýmovo aktívny imobilizovaný materiál. Na 5 g nosiča s adsorbovanou biomasou sa pridáva 30 ml zmesi polyfunkčných činidiel, vymrazí sa 4–6 hodín pri -25°C , premyje sa a deponuje pri $+4^{\circ}\text{C}$ v tlmivom roztoku pH 7,5. Enzýmová aktivita u všetkých spomenutých spôsobov imobilizácie sa zachováva počas 10–12 mesiacov od prípravy.

Pri enzýmovej konverzii sa vychádza z roztokov solí CFS-ov, deproteinizovaného filtrátu fermentačnej pôdy alebo z eluátov z purifikácie CFS-ov, pričom optimálna koncentrácia CFS-ov je 10 000–12 000 $\mu\text{g/ml}$, optimum pH sa pohybuje od 7,9 do 8,1 a teploty od 33 do 35 $^{\circ}\text{C}$. V prípade, že je v bunkách prítomná aj kataláza, je možné ju inaktivovať, pretože v opačnom prípade vznikajú produkty štruktúrneho vzorca II, kde $\text{R} = -\text{COCOOH}$, ktoré sú pre ďalšie enzýmové spracovanie nevhodné. Na inhibíciu katalázy sa používajú anorganické azidy (azid sodný 0,1–0,5 %), kyselina askorbová, peroxid vodíka, zlúčeniny bóru (metaboritan a perborát sodný) atď. Reakcia vyžaduje aeróbne podmienky, optimálna aerácia je 1 liter vzduchu na jeden liter reakčnej zmesi za minútu. Doba reakcie je dva až šesť hodín. Orientačné sledovanie priebehu reakcie sa robí metódou tenkovrstvovej chromatografie na silikagelových platniach s UV₂₅₄ indikátorom, kvantitatívne stanovenie sa robí vysokotlakovou chromatografiou.

Enzýmovou konverziou vzniknuté látky štruktúrneho vzorca II, kde $\text{R} = -\text{COOH}$ možno použiť ako substrát pre enzýmovú prípravu 7-ACK.

Príklad 1

Biomasa *T. variabilis* s aktívnou DAAO, získaná dvojstupňovou kultiváciou na pôde s obsahom metionínu (0,2 %), bola odseparovaná centrifugáciou pri otáčkach 4 000 . min^{-1} počas 30 minút, premytá vodou a deponovaná pri -25°C . Po rozmrazení bola biomasa nariadená tak, aby sušina výslednej suspenzie bola približne 10 %. Bolo pridané 1 % glutaraldehydu a zmes bola miešaná 5 hodín pri laboratórnej teplote. Zosietené bunky boli odseparované centrifugáciou, premyté a rozsuspendedované do tlmivého roztoku pH 7,5 tak, aby sušina bola 10 %. Na enzýmovú konverziu bola použitá takto pripravená suspenzia zosietených buniek v množstve 0,5 ml na 10 ml reakčnej

zmesi obsahujúcej ako substrát sodnú soľ CFS-C, v koncentrácii 12 000 $\mu\text{g/ml}$ a azid sodný 1 mg/ml. Reakcia prebiehala 2 hodiny pri 34 $^{\circ}\text{C}$ za intenzívneho vzdušného trepacom stroji. Hodnota pH bola udržiavaná v rozmedzí 7,9–8,0. Stupeň konverzie bol 88 %.

Príklad 2

Postup prípravy biomasy aj podmienky enzýmovej konverzie sú zhodné s príkladom 1, len na inhibíciu katalázy boli namiesto azidu sodného použité perboritan sodný $\text{NaBO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ alebo perborát sodný $\text{NaBO}_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$.

Stupeň konverzie bol 78 %.

Príklad 3

Postup je zhodný s príkladom 1, pri enzýmovej konverzii boli namiesto sodnej soli CFS-C použité eluáty z purifikácie CFS-ov s koncentraciou 12 000 $\mu\text{g/ml}$ CFS-C. Stupeň konverzie bol 71 %.

Príklad 4

Biomasa produkčného kmeňa bola získaná postupom, opísaným v príklade 1. 24 hodín pred použitím bola pripravená reakčná agregátna zmes, obsahujúca 1 % glutaraldehydu a 2 % polyetylénimínu v destilovanej vode a táto bola intenzívne miešaná pri laboratórnej teplote bez prístupu vzduchu. Agregáty s enzýmovou aktivitou boli pripravené pridaním tejto zmesi k biomase (táto tvorila 25 % reakčnej zmesi), ktorá bola po dôkladnom zhomogenizovaní vymrazená pri -25°C minimálne 8 hodín. Pôsobením činidiel vznikli z biomasy granulovité alebo vločkovité agregáty, z ktorých po rozmrazení boli premývaním vodou odstránené zvyšky reakčnej zmesi, agregáty boli odseparované centrifugáciou alebo odsatím a deponované v tlmivom roztoku pH 7,5 pri $+4^{\circ}\text{C}$. Na enzýmovú konverziu sa navažovalo 0,5 g agregátov na 10 ml reakčnej zmesi, obsahujúcej 10 000 – 12 000 $\mu\text{g/ml}$ sodnej soli CFS-C. Podmienky reakcií sú zhodné s podmienkami, uvedenými v príklade č. 1.

Stupeň konverzie sa pohyboval v rozmedzí od 75 do 83 %.

Príklad 5

Postup je zhodný s príkladom č. 4, len na konverziu boli použité eluáty z purifikácie CFS-C s koncentraciou 12 000 $\mu\text{g/ml}$ CFS-C. Stupeň konverzie sa pohyboval v rozmedzí od 70 do 75 %.

Príklad 6

Postup je zhodný s príkladom č. 4, ale namiesto polyetylénimínu bol pri príprave ag-

regátov použitý tetrametyléndiamín. Stupeň konverzie bol 73 %.

Príklad 7

Postup ako v príklade č. 4, ale namiesto polyetylénimínu bol použitý diaminodipropylamín v rovnakej koncentrácii. Stupeň konverzie bol 75 %.

Príklad 8

Biomasa pripravená postupom, opísaným v príklade 1, bola zriedená na sušinu 10 %. 15 ml biomasy bolo inkubovaných s 5 g alumina silikátového nosiča s priemerom zrn

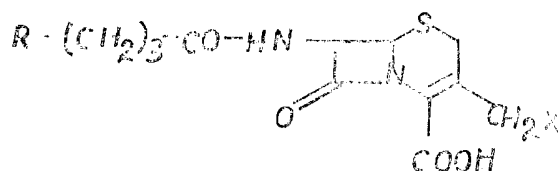
0,5 mm 3 hodiny. Nosič bol premytý vodou, bolo pridaných 30 ml roztoku 1 % glutaraldehydu vo vode a po 4 hodinovom vymrazovaní pri -25°C bol nosič premytý vodou. Na konverziu bolo použitých 5 g na 50 ml zmesi. Podmienky reakcie boli rovnaké ako v príklade č. 1. Stupeň konverzie bol 60 %.

Príklad 9

Biomasa bola kultivovaná v prítomnosti minerálneho nosiča, pridaného do pôdy pred sterilizáciou v množstve 5 % na objem pôdy. Po ukončení fermentácie bol nosič s bunkami premytý a ďalší postup bol zhodný s príkladom č. 8. Stupeň konverzie bol 56 %.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy derivátov cefalosporínov obecného vzorca II



(II)

kde

$X = -\text{OCOCH}_3, -\text{OH}, -\text{H}$

$R = -\text{COOH}$

vyznačujúci sa tým, že sa k vodnému roztoku sodnej soli cefalosporínu C o koncentrácii 3–5 % hmotnostných alebo k eluátu z purifikácie cefalosporínov o koncentrácii 3 až 5 % hmotnostných pridávajú imobilizované bunky kvasinky *Trigonopsis variabilis*

CCY 15–1–2 imobilizované modifikovanými postupmi podľa čs. AO č. 231 458, pričom koncentrácia katalyzátora pri reakcii je 10 až 15 % hmotnostných a koncentrácia inhibítorov vedľajších reakcií 0,1–0,5 % hmotnostných a reakcia prebieha 2–8 hodín pri teplote $32\text{--}36^{\circ}\text{C}$ za intenzívneho miešania a vzdušnenia a získané cefalosporínové deriváty štruktúrneho vzorca II sa izolujú.