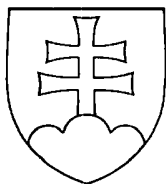


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

## ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 15.11.96  
(31) Číslo prioritnej prihlášky: P 9502300  
(32) Dátum priority: 23.11.95  
(33) Krajina priority: ES  
(40) Dátum zverejnenia: 06.05.98  
(86) Číslo PCT: PCT/ES96/00215, 15.11.96

(21) Číslo dokumentu:

# 979-97

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

**C 12P 17/18//**  
**(C 12P 17/18**  
**C 12R 1:465)**

- (71) Prihlasovateľ: ANTIBIOTICOS, S. A., Madrid, ES;  
(72) Pôvodca vynálezu: Rodriguez Otero Carmelita, León, ES;  
Moreno Valle Miguel Angel, León, ES;  
Lopez Nieto Manuel Jesús, León, ES;  
Collados de la Vieja Alfonso Juan, León, ES;  
Vitaller Alba Alejandro, León, ES;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob produkcie kyseliny klavulanovej a/alebo jej solí**

- (57) Anotácia:  
Je opísaný spôsob produkcie kyseliny klavulanovej a/alebo jej solí pomocou fermentácie s vybranými kmeňmi *Streptomyces clavuligerus* s prísnou kontrolou koncentrácie rozpustného fosforečnanu, prítomného počas fermentácie, a s prípadným použitím uhľíkových zdrojov, ako sú lipidy, výhodne triglyceridy.

11 037

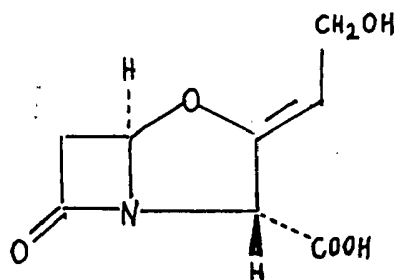
## Spôsob produkcie kyseliny klavulanovej a/alebo jej solí

Oblasť techniky

Je popísaný spôsob produkcie kyseliny klavulanovej a/alebo jej solí pomocou fermentácie s vybranými kmeňmi *Streptomyces clavuligerus* s prísnu kontrolou koncentrácie rozpustného fosforečnanu prítomného počas fermentácie a s prípadným použitím uhľíkových zdrojov ako sú lipidy, výhodne triglyceridy.

Doterajší stav techniky

Kyselina klavulanová je molekula so vzorcom



ktorej použiteľnosť je založená na jej schopnosti inhibovať enzýmy nazývané beta-laktamázy, ktoré sú vlastné niektorým Gram-pozitívnym a Gram-negatívnym patogénnym mikróboom ako je *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* a podobne; a ktoré vďaka svojmu pôsobeniu, im dávajú odolnosť na niektoré beta-laktámové antibiotiká. Výsledkom je, že kyselina klavulanová zmiešaná s uvedenými antibiotikami zvyšuje ich antibakteriálne spektrum.

Je známe, že produkcia kyseliny klavulanovej sa uskutočňuje niektorými kmeňmi, patriacimi do rodu *Streptomyces*, ako je napríklad *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, *Streptomyces jumonjinensis* NRRL 5741 a podobne.

Ako už bolo popísané v predchádzajúcich patentoch (európsky patent 0182522 B1), produkcia kyseliny klavulanovej môže byť zvýšená v dávkovej fermentácii, keď sa asimilovateľný zdroj uhlíka, ako je napríklad glycerol alebo maltóza, pridáva tiež v priebehu fermentácie namiesto pridávania len na začiatku. Avšak zvýšenie produkcie týmto spôsobom je veľmi nízke. V súlade s tým je predmetom predloženého vynálezu nájdenie spôsobu pre získanie kyseliny klavulanovej a/alebo jej solí s produkciou, ktorá je významne vyššia ako tá, ktorá bola dosiahnutá postupmi známymi v odbore.

Mnoho autorov demonštrovalo inhibičný účinok fosforečnanov na produkciu antibiotík (Martin J.F., 1977, Adv.Biochem.Eng. 6:105:127). Špecificky bola zistená inhibícia syntézy cefalosporínov *Streptomyces clavuligerus* fosfátmi (Lübbe C. a spol. 1985, Arch.Microbiol. 140:317-320 a Lübbe C. a spol. 1977, Arch.Microbiol.Lett. 25:75-79; Jhang J. a spol. 1989, FEMS, 57:145-150) a tiež inhibičný vplyv fosforečnanov na syntézu kyseliny klavulanovej rovnakým mikroorganizmom (Lebrihi A. a spol. 1987, Appl.Microbiol.Biotechnol. 26:130:135); Romero J. a spol. 1984, Appl.Microbiol.Biotechnol. 20:318-325). Avšak na rozdiel od poznatkov uvádzaných vo vyššie uvedených článkoch bolo teraz s prekvapením zistené, že namiesto negatívneho účinku fosforečnanov na produkciu kyseliny klavulanovej a/alebo jej solí, ak dosahuje koncentrácia rozpustného fosforečnanu v kultivačnom médiu optimálne rozmedzie a je v tomto rozmedzí udržiavaná, zvyšuje sa produkcia kyseliny klavulanovej a/alebo jej solí. Navyše bolo zistené, že prísna kontrola koncentrácie rozpustného fosforečnanu v kultivačnom médiu má väčší vplyv na zvýšenie produkcie systému než aktuálne pridanie živín. Dávková alebo polokontinuálna (fed-batch) kultivácia *Streptomyces clavuligerus* bola použitá na výrobu kyseliny klavulanovej ako aj iných antibiotík alebo molekúl typicky sekundárneho

metabolizmu.

Na účely tohto popisu výraz dávková kultúra označuje fermentáciu, v ktorej sú zavádzané do kultivačného média živiny len na začiatku a pôda je extrahovaná z fermentačného tanku len na konci procesu. Výraz polokontinuálna (fed-batch) kultúra označuje fermentáciu, v ktorej sú živiny zavádzané do kultivačného média nielen na začiatku, ale počas celej fermentácie a pôda je extrahovaná z fermentačného tanku len na konci procesu. Spôsob dávkovej alebo fed-batch produkcie kyseliny klavulanovej vykazuje niektoré špeciálne rysy fermentácie a to, že na začiatku významne stúpa viskozita, s výsledkom obtiažneho udržiavania prijateľnej koncentrácie rozpusteného kyslíka pre predĺženie produkčnej fázy počas dlhšej časovej periódy. Následkom toho sa objavujú fragmentácia mycelia, zníženie viskozity a redukcia produkcie, čo je na konci procesu nežiadúce.

Kontinuálne kultúra sa výhodne aplikuje na získanie biomasy, aminokyseliny a iných primárnych metabolitov (Hospodka J. 1966, *Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms*, str. 493-645; Malek J. a Fencel Z. vyd. Academic Press New York). Avšak použitie kontinuálnej kultúry na získanie sekundárnych metabolitov (antibiotík) nebolo skutočne popísané alebo bolo uskutočnené s obmedzenou účinnosťou (Vu-Trong K. a Grey, 1982 *Biotechnol. Bioengineering* 24: 1093-1103; Trangott C.S. a spol. 1993 *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39:433-437; Noack D. 1988, *J. Bas. Microbiol.* 28:101-106). Na účely predloženého popisu výraz kontinuálna kultúra označuje fermentáciu, v ktorej sú živiny zavádzané do kultivačného média ako na začiatku tak aj počas fermentácie a niektoré podiely pôdy sú extrahované z fermentačného tanku počas fermentácie a nielen na jej konci. Teraz bolo zistené, že pridaním rozpusteného fosforečnanu do kultivačného média a/alebo riadením a zachovávaním jeho koncentrácie počas fermentácie je možné a

výhodné získať kyselinu klavulanovú a/alebo jej soli v kontinuálnej kultúre s vysokou produkciou. V kontinuálnom procese pomocou vhodného riedenia kultúry sa viskozita počas procesu postupne znižuje, čo umožňuje, aby bola udržiavaná koncentrácia rozpusteného kyslíka (> 40 %) počas dlhšieho časového obdobia bez zvýšenia miešania, s vylúčením fragmentácie mycelia a s predĺžením periódy produkcie kyseliny klavulanovej. V dôsledku pridania živín a vody sa dosiahlo celkové naplnenie kapacity zariadenia, čo vyžaduje kontinuálnu extrakciu pôdy počas fermentačného procesu, buď občasne alebo kontinuálne, za účelom udržania vhodného pracovného objemu. Týmto spôsobom a riadením procesu pridaním rozpustného fosforečnanu ku kultivačnému médiu počas procesu sa dosiahne predĺženie fermentačného cyklu a zvýšenie celkovej produkcie, zvýšenie výťažku produkcie vzhľadom na geometrickú kapacitu zariadenia.

#### Podstata vynálezu

V súlade s tým predložený vynález poskytuje spôsob produkcie kyseliny klavulanovej a/alebo jej solí, kultiváciou vybraných kmeňov *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 a/alebo jej mutantov, v submerznej fermentácii s prevzdušňovaním miešaním, v dávkovej, polokontinuálnej alebo kontinuálnej kultúre, v ktorej koncentrácia rozpustného fosforečnanu prítomného v kultivačnom médiu na začiatku a počas fermentácie je fixovaná a/alebo udržiavaná v rozmedziach, v závislosti na každom použitom type kultúry, 500 až 4000 mg/l na začiatku fermentácie v dávkových kultúrach alebo v prípade polokontinuálnej (fed-batch) alebo kontinuálnej kultúry, medzi 150 a 600 mg/l na začiatku fermentácie a medzi 20 a 150 mg/l počas posledne uvedenej.

Spôsob produkcie kyseliny klavulanovej a/alebo jej solí podľa predloženého vynálezu sa uskutočňuje za prítomnosti zdrojov asimilovateľného C a N a prípadne anorganických

solí. Fermentácia sa uskutočňuje za podmienok prevzdušňovania a v submerznej kultúre.

Optimálna fermentačná teplota je výhodne medzi 20<sup>0</sup>C a 40<sup>0</sup>C, najmä medzi 22<sup>0</sup>C a 30<sup>0</sup>C.

Zdroje uhlíka môžu byť pridané ako jednoduché alebo komplexné živiny len na začiatku (v prípade dávkovej kultúry) alebo v priebehu fermentácie pomocou striedavého alebo kontinuálneho pridávania, v prípade polokontinuálnej (fed-batch) alebo kontinuálnej kultúry. V závislosti na použitom kmeni tieto zdroje uhlíka zahrňujú karbohydráty (dextrín, škrob, maltózu a podobne, polyoly, ako je glycerol, napríklad lipidy najmä triglyceridy, buď prírodné alebo syntetické) a všeobecne akýkoľvek iný zdroj uhlíka, ktorý umožňuje rast mikroorganizmov. Špecificky bolo zistené, že lipidy a špecifickejšie prírodné alebo syntetické triglyceridy môžu byť považované za jeden z preferovaných zdrojov pre uskutočnenie spôsobu podľa vynálezu, pričom zo známeho stavu techniky nie je tento účinok známy. V skutočnosti bolo zistené, že pri použití takýchto zdrojov uhlíka, rovnako ako bez pomoci iného počiatočného pridávania ku kultivačnému médiu (dávková kultúra), môže byť produkcia kyseliny klavulanovej a/alebo jej solí výrazne zvýšená jednoducho sledovaním toho, aby koncentrácia rozpustného fosforečnanu zostala v medziach definovaných predloženým vynálezom. Kultivačné médium by malo obsahovať asimilovateľný zdroj organického alebo anorganického dusíka, ako ja napríklad múčka zo sójových bobov, výluh z kukuričných stoniek, múčka z bavlníkových semien, peptón, kazein alebo síran amónny.

Do kultivačného média môžu byť tiež začlenené rôzne anorganické soli, ako sú chloridy, sírany a fosforečnany sodné, draselné, amónne, soli železa, vápenaté a horečnaté.

Koncentrácia kyseliny kalvulanovej môže byť stanovená mikrobiologicky s použitím mikrobiálnej produkcie beta-laktamázy, ako je napríklad *Klebsiella aerogenes*, aj keď je výhodné uskutočňovať stanovenie pomocou vysoko účinnej kvapalinovej chromatografie.

Extrakcia kyseliny klavulanovej alebo jej solí z pôdy môže byť uskutočnená spôsobom, akým sa iné antibiotiká, špecificky iné beta-laktámy, extrahujú, s použitím iónovymenných živíc alebo rozpúšťadiel alebo akýmikoľvek inými známymi bežnými metódami.

Rozpustný fosforečnan v začiatočnom médiu môže byť stanovený jednoduchým a rýchlym postupom, napríklad pomocou komerčného kitu (Boehringer Mannheim Automated Analysis for BM/Hitachi System 704). Princípom metódy je reakcia anorganického fosforu s molybdátom amónnym. Tento anorganický fosfor je potom vyjadrený ako fosforečnan. Pre analýzu rozpustného fosforečnanu by mala byť vzorka (odobraná homogénne z kultivačnej pôdy) vopred filtrovaná cez Millipore filter s veľkosťou pórov  $0,45\mu\text{m}$  alebo podobne, s cieľom odstránenia tuhých látok. Táto vzorka by mala byť odobraná po sterilizácii kultivačného média, pretože koncentrácia rozpustného fosforečnanu sa môže meniť podľa sterilizácie procesu. Vzorky môžu byť odoberané tiež v priebehu fermentačného procesu.

Skúška celkového fosfátu sa uskutočňuje odobraním 1 ml celkovej pôdy a pridaním 1 ml kyseliny sírovej a 5 ml kyseliny dusičnej. Tento roztok sa odparuje zahrievaním až na konečný objem 1 ml transparentného roztoku. Tento konečný objem sa upraví na 25 ml destilovanou vodou a skúša sa vyššie uvedenou metódou pre rozpustný fosforečnan.

Zistilo sa, že ak sa fermentácia uskutočňuje dávkovo, optimálna koncentrácia rozpustného fosforečnanu na začiatku

fermentácie by mala byť medzi 500 a 4000 mg/l a výhodne medzi 800 a 1600 mg/l.

Ak je vzhľadom na charakter použitých koncentrácií východiskových látok a ich koncentrácií hladina rozpustného fosforečnanu nad alebo pod týmito hranicami, mala by byť upravená. Preto sa môže, ak je hladina pod spodnou hranicou, pridať viac anorganického fosforečnanu pred alebo po sterilizácii, napríklad vo forme draselnej alebo sodnej soli, až po dosiahnutie požadovanej koncentrácie. Alternatívne môže byť časť rozpustného fosforečnanu vyžrážaná, ak je koncentrácia pridaním akéhokoľvek zrážadla veľmi vysoká, napríklad pomocou zlúčeniny vápnika ako je hydroxid alebo octan vápenatý, alebo akýmkoľvek iným systémom, ktorý zaistí, že je dosiahnutý tento cieľ.

V súlade s predloženým vynálezom bolo pozorované až 5-násobné zvýšenie produkcie v porovnaní s fermentačným systémom bez riadenia začiatočného rozpustného fosforečnanu v médiu v dávkovej kultúre. Tabuľka I ukazuje výsledky niekoľkých fermentácií uskutočňovaných s optimálnou koncentráciou rozpustného fosforečnanu a bez tejto koncentrácie.

Tabuľka I

Fermentácia č.	rozpustný fosforečnan mg/l	kyselina klavulanová			
		72 h		96 h	
		μg/l	%	μg/l	%
1(porovnávacie)	18	311	100	420	100
2(porovnávacie)	100	560	180	790	188
3	900	1410	453	2210	533
4	1580	1550	495	2240	533
5	3000	1410	453	1750	416
6(porovnávacie)	7000	410	131	780	186

Zvýšenie v percentách (%) znamená produkciu kyseliny klavulanovej a/alebo jej solí, vyjadrenú ako výsledok vynásobenia konečnej hodnoty v  $\mu\text{g/ml}$  100 a delením tohto výsledku 311 (v prípade 72h inkubácie) alebo 420 (u 96h), čo predstavuje výsledky fermentácie, v ktorej koncentrácia rozpustného fosforečnanu sa nachádza mimo optimálneho rozsahu.

Tento fosforečnan by mal byť rozpustný vo fermentačnej brečke, ako je zrejmé z nasledujúcich výsledkov v tabuľke II, kde podobné koncentrácie celkového fosforečnanu viedli k fermentáciám s veľmi rozdielnymi výsledkami v závislosti na tom, či použitý fosforečnan sa nachádza alebo nenachádza v optimálnych hraniciach.

Tabuľka II

Fermentácia č.	rozpustný fosforečnan mg/l	celkový fosforečnan mg/l	kyselina klavulanová $\mu\text{g/l}$ (96h)
4	1580	2380	2240
7(porovnávací)	230	2265	920

Rozdiel v raste mikroorganizmov pri rôznych fosforečnanových koncentráciách sa nejaví ako zodpovedný za rozdiel v produkcii, aspoň ako hlavný faktor. V tabuľke III je možné pozorovať, že pre podobné rasty sú rôzne hladiny produkcie, takže fosforečnanová hladina sa opäť javí ako spôsobujúca zvýšenie produkcie. Myceliálny objem bol stanovený v odstredivke pri 2500 g po 10 minútach (g znamená gravitačnú silu).

Tabuľka III

č.	Fermentácia rozpustný fosforečnan mg/l	% myceliálneho kyselina klavulanová objemu			
		72h	96h	72h	96h
					μg/l
1(porovnávacía)	18	23	22	311	420
2(porovnávacía)	100	22	22	560	790
3	900	30	30	1410	2210
4	1580	30	30	1550	2240
5	300	30	30	1410	1750
6(porovnávacía)	7000	27	28	410	780

Počas fermentačnej periódy je možné uskutočňovať spôsob fed-batch pridaním fosforečnanu a tiež zvyšku živín distribuovaných celou fermentáciou. Bolo zistené, že optimálna koncentrácia celkového rozpustného fosforečnanu (začiatočného i pridaného) je mierne menšia než koncentrácia pri dávkovom spôsobe a nachádza sa medzi 400 a 2000 mg/l.

Tento vstup by mal byť uskutočnený takým spôsobom, že začiatočná koncentrácia je medzi 150 a 600 mg/l a že koncentrácia rozpustného fosforečnanu vo fermentácii je medzi 20 a 150 mg/l. Preto je treba uskutočňovať vstup rozpustného fosforečnanového iónu alebo akejkoľvek zrážacej vápenatej zlúčeniny, akov v prípade dávkovej fermentácie, v závislosti na tom, či je vyžadované zvýšenie alebo zníženie fosforečnanovej koncentrácie s cieľom jej zachovania v daných hraniciach. Tabuľka IV predstavuje výsledky niekoľkých polokontinuálnych fermentácií uskutočnených pri rôznych koncentráciách rozpustného fosforečnanu, prítomného na začiatku a pridaného.

Je pozorované, že celkové množstvo pridaného fosforečnanu je žiaducim spôsobom vyššie bez zhoršenia

produkcie, ak sa uvedené pridanie uskutočňuje počas fermentácie namiesto na jej začiatku. Všetky pokusy udržujú koncentráciu rozpustného fosforečnanu vo fermentácii na uvedenej koncentrácii s výnimkou fermentácií č. 8, 9 a 10, v ktorých bola koncentrácia nižšia než je požadované a č. 16, kde je koncentrácia vyššia.

Tabuľka IV

Fermentácia č.	rozpustný fosforečnan (mg/l)		kyselina klavulanová	
	začiatočný	celkový	µg/l	%
8	80	0	990	33
9	265	0	1230	41
10	520	0	2400	80
11	990	0	2080	69
12	1530	0	1920	64
13	228	618	3000	100
14	510	570	4020	134
15	722	594	3270	109
16	950	603	2730	91
17	278	1710	3600	120
18	230	2280	3360	112

V kontinuálnej kultúre sa pomocou vhodného riedenia kultúry v priebehu procesu kontinuálne redukuje viskozita, čo umožňuje udržanie koncentrácie rozpusteného kyslíka (> 40%) po dlhšie časové obdobie bez zvýšenia miešania, s vylúčením fragmentácie mycelia a predĺženie periódy produkcie kyseliny klavulanovej. Ako následok pridania živín a vody sa dosahuje úplné naplnenie inštalovanej kapacity, čo vyžaduje kontinuálnu extrakciu pôdy s cieľom udržania vhodného pracovného objemu. Týmto spôsobom a kontrolovaním spôsobu pridávaním rozpustného fosforečnanu ku kultivačnému médiu počas procesu sa dosiahne predĺženie fermentačného

cyklu a zvýšenie celkovej produkcie, zvýšenie produkčného výťažku vzhľadom na geometrickú kapacitu zariadenia.

V kontinuálnej kultúre, ako v predchádzajúcich prípadoch, v dávkovom a polokontinuálnom uskutočnení sa vykonáva začiatkové pridanie rozpustného fosforečnanu. Toto pridanie je vo všeobecnosti menšie než je pre dávkové a polokontinuálne kultúry a je rádovo 150 až 600 mg/l, výhodne na začiatku 200 až 400 mg/l, nasledujúca koncentrácia v brečke rovnakého rádu, 20 až 150 mg/l, sa udržiava po dlhšiu dobu (50 až 100 hodín).

V kontinuálnych kultúrach, ako je dávková alebo polokontinuálna fermentácia, sa vstupy rozpustných fosforečnanových solí alebo vápenatých zlúčenín alebo iných účinných sekvestračných činidiel uskutočňujú s cieľom získania v každom prípade potrebných začiatkových koncentrácií a pre udržanie požadovanej koncentrácie počas fermentácie. Pridanie všetkých rozpustných fosforečnanových solí je podobné alebo mierne vyššie než to, ktoré sa použije v polokontinuálnej fermentácii.

Naviac sa pridáva ku kultivačnému médiu voda, od 32 hodín vyššie, s cieľom udržania viskozity brečky na hodnotách pod 700 cP, ktoré umožňujú zvýšenie množstva živín pridaných v tradičných systémoch, udržanie hladiny rozpusteného kyslíka pod 40 % a predĺženie produkcie kyseliny klavulanovej až na 150 až 170 hodín.

Počas celého procesu sa dosiahne celkové zriedenie 1,5 až 1,6 oproti 0,9 až 1,1 pre tradičné kultúry, čo robí geometrickú kapacitu zariadenia ekonomicky životaschopnou. Spôsob sa uskutočňuje pridaním živín k začiatkovému médiu kontinuálne počas fermentácie. Tieto živiny sú hlavným zdrojom uhlika. Od 100 hodín vyššie sa uskutočňuje kontinuálna alebo prerušovaná extrakcia brečky v pomere

2,5 až 14 % objemu fermentora na deň s cieľom udržania konštantného objemu a viskozity média pod 700cP. Spôsob môže byť predĺžený až na 160 až 170 hodín.

Príklady 19 až 25 sú reprodukované v tabuľke V s fed-batch a kontinuálnymi kultúrami, s rôznymi živinami a rôznymi koncentráciami alebo vstupmi rozpustných fosforečnanov.

Tabuľka V

Č. fermentácia	doba (h)	rozpustný fosforečnan	
		začiatočný	pridaný
19 polokontinuálny	132	150	720
20 "	135	241	550
21 kontinuálny	172	495	625
22 "	150	475	1080
23 "	172	500	1120
24 "	155	445	1145
25 "	150	260	1560

Tabuľka V (pokrač.)

pridanie živín	zriedenie	extrakcia 100 h % deň (O.P.S.)	klavulanová kyselina μg/l	aktivita K/m <sup>3</sup> g
Weichol-92	0,96	-	3150	1,63
olej sójových bobov	1,10	-	3710	2,20
Priol. 1 + glycerol	1,32	2,5%	3890	2,77
"	1,40	9 %	2445	1,85
"	1,61	14 %	2870	2,49
"	1,57	14 %	2680	2,27
Priolube	1,42	9 %	2660	2,06

Weichol-92<sup>R</sup> - syntetický triglycerid  
INDUSTRIA QUIMICA LASSEM

Priolube<sup>R</sup> - glyceryôtrioleát  
UNICHENTA (Holandsko)

O.P.S. objem po sterilizácii

Na ilustráciu slúžia nasledujúce príklady.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Pripraví sa inokulačné múdium nasledujúceho zloženia :

- rybia múčka	-	2 g
- glycerol	-	1,5 g
- rozpustný škrob	-	1,5 g
- uhličitan vápenatý	-	0,2 g
- destilovaná voda	q.s.	100 ml

pH sa upraví na 6,7 a médium sa inokuluje so suspenziou spór mutantného kmeňa, ktorý nadmerne produkuje kyselinu klavulanovú, získaného pomocou stupňa mutácie *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 s

N-metyl-N'-nitro-N-nitrózoquanidínom a niekoľkými stupňami mutácie s ultrafialovým žiarením. Táto suspenzia sa pripraví šikmá alebo plochá so živným médiom umožňujúcim rast a sporuláciu.

Po inokulácii sa médium inkubuje 2 dni pri 25<sup>0</sup>C na rotačnej pretrepávačke s excentricitou 5 cm pri 250 ppm.

Takto pripravená kultúra sa použije na inokuláciu v podiele 5 % fermentačného média nasledujúceho zloženia :

- múčka zo sójových bobov	-	4 g
- kukuričný dextrín	-	1 g
- MOPS pufor	-	1 g
(3-[N-morfolíno]		
propánsulfónová kyselina		
- chlorid vápenatý	-	10 mg
- chlorid sodný	-	10 mg
- chlorid horečnatý	-	10 mg
- octan sodný	-	0,1 g
- olej sójových bobov	-	2 g
- destilovaná voda	q.s.	100 ml

pH média sa upraví na 7,0 a médium sa rozdelí do 250 ml baniek v pomere 30 ml na banku. Banky sa uzavrujú a sterilizujú 20 minút pri 121<sup>0</sup>C. Po sterilizácii sa meria rozpustný fosforečnan v bankách naraz, získa sa hodnota 100 mg/l.

Ako príklad a s cieľom ilustrácie výsledkov fermentácie č.1 uvedenej v tabuľke I bolo do každej banky pridané 0,5 ml 0,5% roztoku hydroxidu vápenatého. Po pridaní bola opäť vyhodnotená koncentrácia rozpustného fosforečnanu v jednej z baniek, teraz bola získaná hodnota 18 mg/l, a pri tejto

koncentracii bola uskutočnená uvedená fermentácia č.1.

Takto pripravené a inokulované fermentačné médium sa inkubuje pri 25<sup>0</sup>C v rotačnej miešačke s excentricitou 5 cm pri 250 ppm. Po 96 hodinách inkubácie bola produkcia získanej kyseliny klavulanovej 420 µg/l HPLC.

#### Príklad 2

Postup je rovnaký ako v príklade 1, ale pridanie hydroxidu vápenatého sa neuskutoční. Výsledkom je, že fermentácia sa uskutočňuje v médiu so 100 mg/l rozpustného fosforečnanu. Po 96 hodinách inkubácie bola produkcia kyseliny klavulanovej 790 µg/ml HPLC (viď fermentácia č.2 z tabuľky I).

#### Príklad 3

Postup je rovnaký ako v príklade 1, ale pridanie hydroxidu vápenatého sa neuskutoční a 0,12 % fosforečnanu monodraselného pridaného pred úpravou pH je zahrnuté v zložení fermentačného média. Rozpustný fosforečnan sa vyhodnotí po sterilizácii z jednej banky a je stanovené, že fermentácia sa uskutočňuje v médiu s 900 mg/l rozpustného fosforečnanu. Po 96 hodinách inkubácie bola produkcia kyseliny klavulanovej 2210 µg/ml HPLC (viď fermentácia č.3 z tabuľky I).

#### Príklad 4

Postup je rovnaký ako v príklade 3, ale v tomto prípade je 0,21 % fosforečnanu monodraselného zahrnuté v zložení. Rozpustný fosforečnan sa vyhodnotí po sterilizácii z jednej banky a je stanovené, že fermentácia sa uskutočňuje v médiu s 1580 mg/l rozpustného fosforečnanu. V tomto prípade sa tiež stanoví celkový fosforečnan a bola získaná hodnota 2380 mg/l, ako je zrejmé z tabuľky II. Po 96 hodinách inkubácie bola produkcia kyseliny klavulanovej 2240 µg/ml HPLC (viď fermentácia č.4 z tabuľky I).

#### Príklad 5

Postup je rovnaký ako v príklade 3, ale v tomto prípade je 0,4 % fosforečnanu monodraselného zahrnuté v zložení. Rozpustný fosforečnan sa vyhodnotí po sterilizácii z jednej banky a je stanovené, že fermentácia sa uskutočňuje v médiu s 3000 mg/l rozpustného fosforečnanu. Po 96 hodinách inkubácie bola produkcia kyseliny klavulanovej 1750 µg/ml HPLC (viď fermentácia č.5 z tabuľky I).

#### Príklad 6

Postup je rovnaký ako v príklade 3, ale v tomto prípade je 0,95 % fosforečnanu monodraselného zahrnuté v zložení. Rozpustný fosforečnan sa vyhodnotí po sterilizácii z jednej banky a je stanovené, že fermentácia sa uskutočňuje v médiu so 7000 mg/l rozpustného fosforečnanu. Po 96 hodinách inkubácie bola produkcia kyseliny klavulanovej 780 µg/ml HPLC (viď fermentácia č.6 z tabuľky I).

#### Príklad 7

Postup je rovnaký ako v príklade 3, ale v tomto prípade je 0,245 % fosforečnanu trojvápenatého zahrnuté v zložení (nie je zahrnutý fosforečnan monodraselný). Rozpustný fosforečnan sa vyhodnotí po sterilizácii z jednej banky, výsledok je 230 mg/l rozpustného fosforečnanu. V tomto prípade sa tiež stanoví celkový fosforečnan, výsledok je 2265 mg/l (viď fermentácia č.7 z tabuľky II). Po 96 hodinách inkubácie bola produkcia kyseliny klavulanovej 920 µg/ml HPLC.

#### Príklad 8 až 18

Prípraví sa inokulačné médium rovnakého zloženia ako je popísané v príklade 1 a je rozdelené do 2000 ml Erlenmayerových baniek s 500 ml média. Banky sa uzavru a sterilizujú pri 121<sup>0</sup>C po dobu 20 minút.

Po uskutočnení inokulácie so spórmi suspenzie podobnej tej, ktorá bola použitá v príklade 1, sa médium

inkubuje 2 dni pri 25<sup>0</sup>C na rotačnej pretrepávačke s excentricitou 5 cm pri 250 ot.min<sup>-1</sup>.

400 ml tejto kultúry sa odoberie a použije na inokuláciu tanku so 150 litrami nasledujúceho média :

- múčka sójových bobov	-	2	g
- dextrín	-	2	g
- fosforečnan monodraselný	-	0,04	g
- olej sójových bobov	-	0,1	g
- UCON protipeniace činidlo (polyalkylénglykol)	-	0,1	g
- voda	q.s.	100	ml

pH média sa upraví na 7,3 a médium sa sterilizuje pri 121<sup>0</sup>C po dobu 20 minút. Inkubácia sa uskutočňuje pri 28<sup>0</sup>C po dobu asi 30 hodín za miešania pri 115 ot.min<sup>-1</sup>, prevzdušňovania 0,5 obj./obj./min a tlaku v kopuli 1 kg/cm<sup>2</sup>.

45 litrov kultúry inkubovanej za vyššie uvedených podmienok sa odoberie do tanku so 450 litrami nasledujúceho média :

- múčka sójových bobov	-	4	g
- dextrín	-	2	g
- olej sójových bobov	-	0,1	g
- UCON protipeniace činidlo (polyalkylénglykol)	-	0,1	g
- chlorid horečnatý	-	0,02	g
- chlorid železitý	-	0,003	g
- chlorid vápenatý	-	0,01	g
- voda	q.s.	100	ml

pH média sa upraví na 7,0 a médium sa sterilizuje pri 121<sup>0</sup>C po dobu 20 minút. Po sterilizácii sa meria rozpustný fosforečnan, v tomto prípade sa získa výsledok 200 mg/l až 300 mg/l. Ak je to nevyhnutné vzhľadom na získanie rôznych koncentrácií, upraví sa táto hodnota pridaním vhodných

objemov 1 % roztoku fosforečnanu monodraselného (príklady 10, 11, 12, 14, 15 a 16), alebo zlúčeninou vápnika (príklad 8, kde sa pridáva vhodný objem  $\text{Ca(OH)}_2$  roztoku. Po upravení rozpustného fosforečnana sa vykoná prenos 45 litrov inokulačnej kultúry a uskutoční sa fermentácia. Táto sa uskutočňuje pri udržovaní konštantnej teploty  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $115 \text{ ot.min}^{-1}$ ,  $0,5 \text{ obj./obj./min}$  po prvých 24 hodinách a  $1,5 \text{ obj./obj./min}$  po 25 hodinách až do konca fermentácie a za tlaku v kopuli  $0,5 \text{ kg/cm}^2$ .

Rôzne koncentrácie rozpustného fosforečnanu počas fermentácie boli získané pridaním rôznych objemov sterilného 1 % roztoku fosforečnanu monodraselného (príklady 13 až 18).

Automatická kontrola pH sa uskutočňuje s cieľom udržania tejto hodnoty medzi 6,8 a 7,2. Uskutočnia sa tiež nasledujúce prídania :

- olej sójových bobov : 100 ml/h od 10 do 120 hodín
- 33 % glycerol > 400 ml/h od 32 do 120 hodín
- 1 % fosforečnan monodraselný : 400 až 1400 ml/h od 0 do 25 hodín a 1500 až 5000 ml/h od 25 do 50 hodín.

Po 120 hod. inkubácie sa produkcia kyseliny klavulanovej mení medzi 900 a 4020  $\mu\text{g/ml}$  v súlade s tabuľkou IV.

#### Príklad 19

Príprava média a stanovenie fermentačných podmienok sa uskutoční ako v príkladoch 8 až 18 (tabuľka IV), ale koncentrácia 34 g/l dextrínu je zahrnutá v začiatočnom cykle. Prídanie glycerolu je vynechané a boli doplnené len Weichol-92 (syntetický triglycerid so 60 % kyselinou olejovou, vyrábaný Industria Quimica Lasse) a 1 % fosforečnan monodraselný boli dodávané s nasledujúcimi programami prídávania :

Weichol-92	100 ml/h od 10 do 120 h	
fosforečnan		
monodraselný (1%)	400 až 1400 ml/h od 0 do 25 h	a
	1500 až 5000 ml/h od 25 h do 50 h	

#### Príklad 20

Postup je rovnaký ako v príklade 19, ale fermentácia je predĺžená až na 172 h, kontinuálny systém sa stanoví extrakciami celkovej brečky od 100 hodín pokračovania fermentácie v podiele 2,5 % brečky extrahovanými každých 24 h vzhľadom na začiatkový objem fermentora po sterilizácii.

Pridania glycerolu (33%), Priolube (glyceryltrioléat, vyrábaný Unichenta) a fosforečnanu monodraselného (1%) sa uskutočňujú podľa nasledujúcich programov :

Priolube	100 ml/h od 10 h do konca	
glycerol (33%)	400 ml/h od 32 h do konca	
fosforečnan		
monodraselný (1%)	400 až 1400 ml/h od 0 do 25 h	a
	1500 až 5000 ml/h od 25 do 50 h	

#### Príklad 22

Postup je rovnaký ako v príklade 21, ale fermentácia je predĺžená len na 150 h a extrakcia brečky sa uskutočňuje v podiele 9 % každých 24 h. Pridania sú modifikované podľa programu :

Priolube	100 ml/h od 10 h do 100 h	
	200 ml/h od 100 h do konca	
glycerol (33%)	420 ml/h od 32 h do 100 h	
	780 ml/h od 100h do konca	
fosforečnan		
monodraselný (1%)	400 až 1400 ml/h od 0 do 25 h	a
	1500 až 5000 ml/h od 25 do 50 h	
sterilná voda	312 ml/h od 32 do 100 h	
	625 ml/h od 100 h do konca	

### Príklad 23

Postupuje sa rovnako ako v príklade 22. Fermentácia sa predĺži na 172 h s extrakciou 14 % každých 24 h. Tiež je zahrnuté pridanie sterilnej vody s cieľom udržania nízkej hladiny viskozity.

Priolube	130 ml/h od 10 h do 100 h	
	240 ml/h od 100 h do konca	
glycerol (33%)	515 ml/h od 32 h do 100 h	
	960 ml/h od 100h do konca	
fosforečnan		
monodraselný (1%)	400 až 1400 ml/h od 0 do 25 h	a
	1500 až 5000 ml/h od 25 do 50 h	
	300 ml/h od 50 h do konca	
sterilná voda	630 ml/h od 32 do 100 h	
	1260 ml/h od 100 h do konca	

### Príklad 24

Postupuje sa rovnako ako v príklade 23, ale začiatkové fermentačné médium sa zvýši o 30 % vzhľadom ku všetkým jeho východiskovým látkam. Fermentácia prebieha 155 h a extrakcia sa uskutočňuje každých 24 h. Použité programy pridávania sú nasledujúce :

Priolube	130 ml/h od 10 h do 100 h	
	240 ml/h od 100 h do konca	
glycerol (33%)	515 ml/h od 32 h do 100 h	
	960 ml/h od 100h do konca	
fosforečnan		
monodraselný (1%)	400 až 1400 ml/h od 0 do 25 h	a
	1500 až 5000 ml/h od 25 do 50 h	
	300 ml/h od 50 h do konca	
sterilná voda	630 ml/h od 32 do 100 h	
	1260 ml/h od 100 h do konca	

### Príklad 25

Postupuje sa rovnako ako v príklade 21. Fermentácia sa predĺži na 150 h a extrakcie sa uskutočňujú v rozsahu 9 %

každých 24 h. Pridanie glycerolu je úplne vynechané a pridanie triglyceridu Priolube je zvýšené. Pridania fosforečnanu a sterilnej vody sú rovnaké ako pridania v príklade 22. Pridanie Priolube je podľa nasledujúceho programu :

Priolube	320 ml/h od 10 h do 100 h
	590 ml/h od 100 h do konca

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Spôsob produkcie kyseliny klavulanovej a/alebo jej solí kultiváciou *Streptomyces clavuligerus* ATCC 2704 alebo jeho mutantov z nej získaných, v submerznej fermentácii s prevzdušňovaním a miešaním, v dávkovej, polokontinuálnej alebo kontinuálnej kultúre, v ktorej sú koncentrácie rozpustného fosforečnanu určené na začiatku a/alebo udržiavané počas fermentácie v daných hodnotách.

2. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že prítomná koncentrácia rozpustného fosforečnanu prítomného v médiu na začiatku fermentácie, v dávkovej kultúre, je pevne stanovená v rozmedzí od 500 do 4000 mg/l.

3. Spôsob podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že prítomná koncentrácia rozpustného fosforečnanu prítomného v médiu na začiatku fermentácie, v polokontinuálnej alebo kontinuálnej kultúre, je pevne stanovená v rozmedzí od 150 do 600 mg/l a/alebo je udržiavaná v danom rozsahu, výhodne od 20 do 150 mg/l, počas fermentácie.

4. Spôsob podľa nároku 1 až 3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že prítomné koncentrácie rozpustného fosforečnanu prítomného v kultivačnom médiu sú na začiatku pevne stanovené a/alebo sú udržiavané počas fermentácie pridaním rozpustného fosforečnanového iónu, v akejkoľvek z jeho foriem, k uvedenému kultivačnému médiu.

5. Spôsob podľa nároku 1 až 3, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že prítomné koncentrácie rozpustného fosforečnanu prítomného v kultivačnom médiu sú na začiatku pevne stanovené a/alebo sú udržiavané počas fermentácie zrážaním uvedeného rozpustného fosforečnanu, ak tento presahuje požadované hranice.

6. Spôsob podľa nároku 5, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený rozpustný fosforečnan sa zráža pridaním vápenatej zlúčeniny ku kultivačnému médiu.

7. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že sa použije zdroj uhlíka, ktorý obsahuje jeden alebo viac prírodných alebo syntetických triglyceridov, ktoré sa pridávajú na začiatku fermentácie a/alebo počas nej.

8. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že ako výlučný zdroj sa použije jeden alebo viac prírodných alebo syntetických triglyceridov, ktoré sa pridávajú na začiatku fermentácie a/alebo počas nej.

9. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že fermentácia sa uskutočňuje pri teplote 20 až 40<sup>0</sup>C.

10. Spôsob podľa ktoréhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že fermentácia sa uskutočňuje pri teplote 22 až 30<sup>0</sup>C.