



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

231402

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 18 09 63
(21) (PV 5140-63)

(51) Int. Cl.³

C 12 P 37/00

(45) Vydáno 15 06 86

(75)

Autor vynálezu

ROUBÍČEK RUDOLF ing. RNDr., ZAJÍČEK JIŘÍ ing., PRAHA,
DAŠEK JAROSLAV RNDr., BANSKÁ BYSTRICA, BENDA ANTONÍN ing.,
HEROLD MILOŠ prof. ing. DrSc., PRAHA

(54) Způsob výroby penicilinu G nebo V

Vynález se týká způsobu výroby penicilinu G nebo V za plynulého dávkování sacharidů v závislosti na pH.

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

Výrobě penicilinů, a to jak penicilinu G, tak i penicilinu V, jako nejdůležitějším antibiotikům, je stále věnována značná pozornost, která je především zaměřena na ekonomizaci výrobního procesu, zejména na jeho fermentační část.

Maximálního efektu se snaží různí výrobci dosáhnout použitím speciálně šlechtěných vysokoprodukčních izolátů nebo s daným izolátem pomocí fermentace zaměřené na nejhospodárnější suroviny.

Zásadně však platí, že pro vlastní fermentaci a pro optimální podmínky produkčních kmenů musí základní živná půda obsahovat optimální množství asimilovatelných zdrojů uhlíku a dusíku, kromě dalších specifických látek a prekurzorů.

V odborné literatuře i v patentních spisech je popsáno mnoho způsobů fermentační výroby penicilinu, týkajících se použití koncentrací a kombinací různých surovin, různých podmínek technologie, jako i šlechtění a výběru vysokoprodukčních kmenů. I při výrobě s kmenem daných vlastností je však možno dále vhodnými úpravami technologie a vhodnou volbou surovin dosáhnout maximálních výtěžků a hospodárnosti procesu.

Základním typem fermentačních surovin je systém kukuřičný výluh - laktóza, popisovaný v různých kombinacích. Kukuřičný výluh bývá nahrazován arašidovou moukou, sójovou moukou, bavlníkovým semenem apod. Laktóza jako zdroj uhlíku je nahrazována např. glukózou nebo sacharózou.

Použití těchto cukrů zvyšuje sice hospodárnost procesu a umožňuje řídit přímo spotřebu cukru v průběhu fermentace, značně se však ztěžuje technologické vedení, poněvadž je nutno přizpůsobovat vhodná dávkovací zařízení a nepřetržitě přesně kontrolovat fermentační proces.

Studiem fermentací s lehce asimilovatelnými zdroji uhlíku se zabývá řada prací (J. Noguchi se sp., Nippon-Nogei-kagaku Kaishi 10, 511, /1955/), srovnávajících např. výtěžnost při použití laktózy a glukózy nebo popisujících fermentaci při pomalém přidávání zdrojů uhlíku, tj. glukózy, sacharózy, melasy a laktózy (A. Serzedello, Boll. ins. zimotec. /Sao Paolo/ 15, 3, /1956/) nebo náhradu laktózy nebo glukózy sacharózou (M. J. Thirumalachar, K. S. Gopalkrishnan, v knize "Antibiotics, their production, utilization and mode of action, Symposium Pimpri, 1956).

Mechanismus biosyntézy penicilinu s přihlédnutím k použití laktózy, resp. sacharózy byl rovněž sledován v řadě prací A. Balio, Boll. soc. ital. biol. sper. 31, 1 338, (1955), ref. Chem. Abstr. 50, 11 4301, (1956); E. Gosh, Hind. Antibiot. Bull. 1, 59, (1958), ref. British Abstr. 33, 30 605, (1959); V. N. Desphande, K. Ganapathi, J. Sci. Research (India) 17C, 59, (1958), ref. Chem. Abstr. 53, 14 6811, (1959); J. I. Roshan, K. Ganapathi, Nature 183, 758, (1959)].

Vliv rychlosti asimilace cukrů na produkci sledovala N. M. Neronova (Mikrobiologija 27, 687, /1958/), použití kukuřičného škrobu jako zdroje uhlíku popsál L. Yu se sp. (Cem. Abstr. 53, 18376h, /1959/).

Základní význam má však postup publikovaný F. V. Solterem a M. J. Johnsonem (Appl. Microbiol. 2, 41, /1954/), při kterém se používá jako zdroje lehce asimilovatelného uhlíku sacharózy, přidávané stále stejnou rychlostí k fermentační půdě.

Druhý základní princip (US pat. spis č. 2830934) spočívá v tom, že se na začátku bio-

syntézy penicilinu vychází z půdy, prosté zdrojů asimilovatelného uhlíku, které se potom přidávají pouze v průběhu fermentace (glukóza, sacharóza, melasa) takovou rychlostí, která se rovná rychlosti spotřeby laktózy v pokuse, probíhající paralelně za stejných podmínek.

Z citovaných postupů jen poslední dva mají zásadní význam a lze je aplikovat v provozním měřítku.

Při jejich ověřování však bylo zjištěno, že při rovnoměrném přívodu sacharózy v prvním případě dochází v některých fázích fermentace k jejímu předávkování, v jiných fázích opět k nedostatečnému dávkování, což se v obou případech projevuje nepříznivě v metabolismu produkčního mikroorganismu a v souvislosti s tím i ve snížení produkce, v porovnání s kontrolní fermentací s laktózou.

Pro dosažení produkci srovnatelných s kontrolní laktózovou fermentací bylo zapotřebí neúměrně vysokého množství sacharózy. Při ověřování druhého postupu, který je v porovnání s prvním postupem o něco výhodnější, bylo zjištěno, že průběh metabolismu při použití laktózy a sacharózy je podstatně odlišný a že není možno se při dávkování sacharózy řídit schématem spotřeby laktózy.

Při srovnání tohoto postupu s kontrolní laktózovou fermentací vyšly najevo značné výkyvy v produkci, i když celková spotřeba sacharózy odpovídala spotřebě laktózy.

Bylo zjištěno, že nevýhody dosavadních způsobů lze odstranit podle vynálezu při způsobu výroby penicilinu G nebo V, kultivací produkčního mikroorganismu za submertních podmínek, v tekuté živné půdě, obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli a prekurzory, s kontinuálním nebo semikontinuálním přidáváním zdrojů asimilovatelného uhlíku, zejména sacharózy.

Podstata tohoto způsobu spočívá v tom, že se veškerá sacharóza přidává do základní živné půdy, prosté cukrá, po naočkování produkčním mikroorganismem, takovou rychlostí, aby se hodnota pH půdy udržovala v průběhu fermentace v rozmezí 6,5 až 7,5, s výhodou v rozmezí 7,0 až 7,4.

Lze postupovat též tak, že se k základní živné půdě, obsahující nejméně 20 % celkového množství použitých zdrojů asimilovatelného dusíku, přidává zbyvající část celkového množství použitých zdrojů dusíku současně se sacharózou.

Při provedení způsobu podle vynálezu je indikátorem optimální spotřeby sacharózy hodnota, která je pro určitý produkční kmen nejvhodnější. Při přebytku sacharózy je metabolismus podstatně rychlejší, hodnota pH půdy klesá, dochází k poruše metabolismu, až ke stagnaci produkce.

Naproti tomu nedostatek sacharózy se projevuje velmi rychle autolýzou mycelia, zvyšováním pH do alkalické oblasti a zastavením produkce, resp. rychlým úbytkem koncentrace již vzniklé účinné látky.

Vhodné dávkování sacharózy podle průběhu pH půdy při fermentaci umožňuje udržovat jeho hodnotu v mezích odchylky o 0,1 až 0,3 od hodnoty optimální.

Začátek fermentace asi do 10. hodiny je přizpůsoben minimální spotřebě sacharózy a dávkování je postupně zvyšováno tak, že maxima jeho rychlosti je dosaženo mezi 30. a 60. hodinou kultivace.

Sacharózu je možno přidávat některým běžně známým postupem ať už kontinuálně nebo ve velmi krátkých intervalech. Rychlost dávkování se obvykle mění podle potřeby v 5 až 20hodin-

nových intervalech. Při dodržování dávkování sacharózy způsobem podle vynálezu je možné s daným produkčním kmenem dosáhnout maximální produkce, poněvadž jsou vytvořeny optimální podmínky pro růst a produkci v jednotlivých fázích fermentace.

Pro daný produkční kmen zůstává schéma rychlosti dávkování sacharózy při fermentacích s normálním průběhem neměnné a je možné potom s výhodou pracovat podle předem určeného programu dávkování.

Další předností tohoto postupu je to, že v mimořádném případě vychýlení pH z optimální oblasti (např. při změně rychlosti růstu kultury) je indikován současně nedostatek nebo přebytek zdroje uhlíku a okamžitým zásahem do dávkování je možno upravit jak optimální koncentraci živin tak i hodnotu pH do vyhovující oblasti.

Zpočátku je fermentace vedena tak, aby optimální pH prostředí pro produkci bylo dosaženo ve 20. až 30. hodině kultivace. Tak vzniká vlastní schéma spotřeby sacharózy, které je shodné se schématem rychlosti jejího dávkování.

Toto schéma se ovšem podstatně liší od schématu spotřeby laktózy. Vlastní průběh fermentace je potom maximálně ekonomický a ve srovnání s laktózovým postupem je spotřeba sacharózy za přibližně stejnou dobu fermentace až o 20 % nižší a produkce naproti tomu při použití stejného produkčního kmene, za stejnou kultivační dobu a za stejných kultivačních podmínek, je až o 30 % vyšší.

Dále bylo zjištěno, že je možné pro zvýšení výtěžků v prodloužené kultivační době použít takového postupu, při kterém se současně se sacharózou dává do půdy též zdroj snadno asimilovatelného dusíku, s výhodou rozpustného ve vodě (např. kukuřičný výluh, močovina, dusičnan sodný atd.).

Přitom základní živná půda obsahuje pouze část celkového množství zdrojů dusíku a zbývající část se přidává k půdě v průběhu fermentace.

P ř í k l a d

Produkční živná půda měla složení: 2 % kukuřičného výluhu, 2 % arašidové moučky, 0,7 % uhlíkatu vápenatého, 0,3 % síranu sodného a 0,25 % kyseliny fenoxycetové. Po sterilizaci měla půda pH 6,5.

Po naočkování 10 % inokula produkčního mikroorganismu bylo zahájeno dávkování 50% roztoku sacharózy (hmotnost. objem) tak, aby hodnota pH se pohybovala kolem hodnoty optimální pro použitý produkční kmen (7,0 až 7,3). Průběh biosyntézy penicilinu V byl tento:

hodina fermentace	0	10	20	30	40	50
pH	6,5	6,8	6,9	7,0	7,2	7,0
sacharóza v %/hod.	0,01	0,02	0,06	0,10	0,09	0,09
j/ml.10 ³	-	-	-	-	2,0	2,8

hodina fermentace	60	70	80	90	100
pH	7,1	7,2	7,2	7,2	7,3
sacharóza v %/hod.	0,08	0,06	0,04	0,04	-
j/ml.10 ³	3,9	4,5	5,0	5,4	5,9

Za základ procentuálního složení půdy a množství přidávané sacharózy byl vzat výchozí objem 35 m³. Konečný objem (+ roztok sacharózy, - odpar a ztráty vzorkováním apod.) byl 37 m³.

P ř í k l a d 2

Složení živné půdy jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že místo kyseliny fenoxycetové bylo použito celkem 0,35 % fenylacetanu amonného, který byl přidáván v 12hodinových intervalech v 5 dávkách, počínaje 12. hodinou kultivace. Průběh biosyntézy penicilinu G byl tento:

hodina fermentace	0	10	20	30	40	50
pH	6,4	6,7	7,0	7,2	7,4	7,3
sacharóza v %/hod.	0,01	0,02	0,06	0,10	0,09	0,09
j/ml.10 ³	-	-	-	-	3,1	3,9
hodina fermentace	60	70	80	90	100	
pH	7,1	7,2	7,3	7,3	7,3	
sacharóza v %/hod.	0,08	0,06	0,04	0,04	-	
j/ml.10 ³	4,3	5,0	5,7	6,4	7,1	

Výchozí objem půdy byl 35 m³, konečný objem 36 m³

P ř í k l a d 3

Produkční živná půda měla složení: 1 % kukuřičného výluhu, 1 % arašidové moučky, 0,7 % uhličitanu vápenatého, 0,3 % síranu sodného, 0,25 % kyseliny fenoxycetové.

Po sterilizaci měla půda pH 6,5. Po naočkování 10% inokula produkčního kmene bylo zahájeno dávkování roztoku obsahujícího 50 % sacharózy a 15 % sušiny kukuřičného výluhu, a to takovou rychlostí, aby pH se udržovalo kolem optimální hodnoty.

Celkem bylo přidáno 9,2 % sacharózy a 2,75 % sušiny kukuřičného výluhu. Průběh biosyntézy penicilinu V byl tento:

231402

6

Hodina fermentace	0	10	20	30	40	50	60
pH	6,5	6,7	7,0	7,3	7,4	7,4	7,4
sacharóza v %/hod. g/ml.10 ³	0,01 -	0,03 -	0,08 -	0,10 -	0,10 2,0	0,10 2,9	0,10 3,8
hodina fermentace	70	80	90	100	110	120	130
pH	7,3	7,5	7,4	7,4	7,3	7,5	7,7
sacharóza v %/hod. g/ml.10 ³	0,08 4,6	0,10 5,1	0,10 5,7	0,04 5,8	0,04 6,4	0,04 6,7	- 7,1

Výchozí objem půdy byl 10 litrů, konečný objem 10,5 litru.

P ř í k l a d 4

Produkční živná půda měla složení: 2 % kukuřičného výluhu, 0,7 % uhličitanu vápenatého, 0,3 % síranu sodného, 0,25 % fenylactanu amonného, který byl přidáván v průběhu kultivace podobně jako v příkladu 2.

Po sterilizaci měla půda pH 6,5. Po naočkování 10% inokula produkčního mikroorganismu bylo zahájeno dávkování roztoku, obsahujícího 50 % sacharózy, 10 % sušiny kukuřičného výluhu a 0,65 % močoviny.

Celkově přidáno 1 860 ml roztoku, tj. 9,3 % sacharózy, 1,86 % kukuřičného výluhu a z močoviny tolik dusíku, kolik odpovídá 0,93 % sušiny kukuřičného výluhu. Průběh biosyntézy penicilinu G byl tento:

hodina fermentace	0	10	20	30	40	50	60
pH	6,5	6,8	7,1	7,3	7,4	7,5	7,4
sacharóza v %/hod. g/ml.10 ³	0,01 -	0,03 -	0,09 -	0,09 -	0,09 2,8	0,10 3,4	0,10 3,9
hodina fermentace	70	80	90	100	110	120	130
pH	7,5	7,5	7,4	7,4	7,3	7,5	7,6
sacharóza v %/hod. g/ml.10 ³	0,10 4,5	0,10 4,85	0,08 5,8	0,06 6,9	0,04 7,7	0,04 7,7	- 8,2

Základní množství půdy bylo 10 litrů, konečné množství 11 litrů.

P ř í k l a d 5

Produkční živná půda měla složení: 2 % kukuřičného výluhu (sušina), 0,7 % uhličitanu vápenatého, 0,3 % síranu sodného a 0,25 % kyseliny fenoxycetové. Po sterilizaci měla půda pH 6,5.

Po naočkování 10% inokula produkčního mikroorganismu bylo zahájeno dávkování roztoku, obsahujícího 50 % sacharózy, 10 % sušiny kukuřičného výluhu a 0,85 % dusičnanu amonného.

Bylo přidáno celkem 1 720 ml roztoku, tj. 8,6 % sacharózy, 1,72 % sušiny kukuřičného výluhu a z dusičnanu amonného tolik dusíku, kolik odpovídá 0,86 % sušiny kukuřičného výluhu. Průběh biosyntézy penicilinu V byl tento:

hodina fermentace	0	10	20	30	40	50	60
pH	6,5	6,7	6,9	7,0	7,4	7,3	7,3
sacharóza v %/hod. j/ml.10 ³	0,01	0,04	0,06	0,09	0,1	0,1	0,1
	-	-	-	-	2,1	3,0	3,9
hodina fermentace	70	80	90	100	110	120	130
pH	7,3	7,4	7,3	7,4	7,3	7,2	7,3
sacharóza v %/hod. j/ml.10 ³	0,08	0,10	0,08	0,06	0,04	-	-
	4,6	5,1	5,4	6,0	6,5	6,9	7,2

Základní množství půdy bylo 10 litrů, konečné množství 10,5 litrů.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob výroby penicilinu G nebo V, kultivací produkčního mikroorganismu za submerzních podmínek, v tekuté živné půdě, obsahující zdroje asimilovatelného uhlíku a dusíku, minerální živné soli a prekurzory, s kontinuálním nebo semikontinuálním přidáváním zdrojů asimilovatelného uhlíku, zejména sacharózy, vyznačující se tím, že se veškerá sacharóza přidává do základní živné půdy, prosté cukrů, po naočkování produkčním mikroorganismem, takovou rychlostí, aby se hodnota pH půdy udržovala v průběhu fermentace v rozmezí 6,5 až 7,5, s výhodou v rozmezí 7,0 až 7,4.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se k základní živné půdě, obsahující nejméně 20 % celkového množství použitých zdrojů asimilovatelného dusíku, přidává zbývající část celkového množství použitých zdrojů dusíku současně se sacharózou.