



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

198425
(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁸
C 12 ~~35~~ 35/06

Poznam

(22) Prihlásené 22 11 76
(21) (PV 7495-76)

(40) Zverejnené 17 09 79

(45) Vydané 30 08 82

(75)
Autor vynálezu

WELWARD LADISLAV ing. CSc., BANSKÁ BYSTRICA, KOŠALKO RUDOLF
ing. CSc. a FRIMM RICHARD doc. ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob fermentačnej výroby cefalosporínu C

Predložený vynález popisuje spôsob fermentačnej výroby cefalosporínu C s pomocou kmeňa *Acremonium chrysogenum* CCM F-644 za submerzných aerobných podmienok.

Objavenie cefalosporínu C (ďalej CFS-C) vyvolalo intenzívny záujem v oblasti chemoterapie, pretože toto antibiotikum je účinné na G⁺ a G⁻ mikroorganizmy, hlavne stafylokoky rezistentné voči penicilínom. Mechanizmus jeho pôsobenia je zhodný s penicilínom – zasahuje syntézu bunecnej steny. Samotný CFS-C má veľmi nízku aktivitu, ale deriváty jeho skeletu 7-aminocefalosporánovej kyseliny sú látky klinicky vysoko účinné. CFS-C je v literatúre široko popísaný napr. v práci E. H. Flynn: *Cephalosporins and Penicillins* Academic Press, New York and London, 1972, kde je napríklad zdôvodnená aj jeho mikrobiálna syntéza vznikom heterocyklických tripeptidov zložených z α -aminoadipovej kyseliny, cysteinu a valínu. CFS-C je produkovaný mikroorganizmami z rodu *Cephalosporium* a *Emicellopsis* súčasne s inými látkami majúcimi antibakteriálne vlastnosti ako sú napr. cefalosporín N a cefalosporín P.

Príprava CFS-C s kmeňom *Cephalosporium* Sp. kmeň F-12 je chránená patentom NSR – 2239321 z 22. 2. 1973, ďalej s kmeňom *Cephalosporium polyaleurum* – US patent 3,816,257 z 11. 5. 1974 a tiež starším patentom US – 3,082,155 z 19. 10. 1963,

kde ako produkčný kmeň sa používa *Cephalosporium acremonium* IMI 49137.

Nami navrhovaný spôsob fermentačnej výroby CFS-C sa vyznačuje tým, že sa od doterajších postupov líši v príprave produkčného kmeňa a tým v celej pomnožovacej časti. Jeho novosť spočíva v tom, že kmeň po vyočkovaní zo šikmého agaru sporulačnej pôdy je submerzne pomnožený v baničkovej inokulačnej pôde na rotačnom trepačnom stroji pri teplote 28 °C za 72 hodín.

Takto získaným narasteným submerzným inokulom – teda nie spórmi – sú očkované jačmenné krúpy, ku ktorým bola pridaná arašidová múka a Čzapek-Doxov roztok. Po 11 dňoch inkubovania pri teplote 23 až 28 °C sa získajú vysporulované konzervy s kmeňom *Acremonium chrysogenum* CCM F-644, ktoré obsahujú asi 10⁷ až 10⁹ konidií v konzerve. Touto striedavou pasážou produkčného kmeňa sa zaistí produkčná aktivita pomnoženej kultúry a rýchly nárast inokula potrebného pre očkovanie následného väčšieho objemu. Takéto inokulum zaručuje po kmeňovej stránke štandardný nárast *Acremonium chrysogenum* v produkčnej kultivačnej pôde, čím súčasne znižuje riziko kontaminácie, ktoré je najväčšie práve v týchto počiatočných rastových fázach. Striedavá pasáž podľa schémy spóry – vegetatívna forma – spóry

sa osvedčila napríklad pri príprave kmeňa *Penicillium chrysogenum* a je popísaná v L. Welward, Folia Microbiologica, 18, 163, 1973. Kultivačná pôda pre prípravu vegetatívneho inokula je veľmi jednoduchá – ako zdroj asimilovateľného uhlíka sa použije polysacharid alebo disacharid prípadne melasa, zdrojom organického dusíka môže byť peptón alebo kukuričný výluh a anorganický dusík sa vnáša do tejto pôdy octanom amónnym. Kultivuje sa pri teplote 23–30 °C aerobne za prítomnosti odpeňovadla podľa podmienok kultivácie 48–72 hodín. Takto pripravenými 5–10 obj. percentami inokula sa očkuje produkčná pôda, ktorá obecné pozostáva:

zo zdroja asimilovateľného uhlíka, ktorý môže byť reprezentovaný polysacharidami vo vode rozpustnými alebo nerozpustnými, disacharidami ako sú napr. sacharóza, laktóza, galaktóza, fruktóza, glukóza, manit, sorbit. Môže sa tiež použiť melasa.

Ďalšou súčasťou pôdy sú látky majúce odpeňovacie vlastnosti, ktoré súčasne sú produkčným kmeňom obvykle asimilovateľné. Sú to z rastlinných olejov – sojový, slnečnicový, olivový, ľanový, kokosový, repkový, zo živočíšnych tukov – bravčová masť, loj resp. hydrolyzáty z oboch skupín. Zvlášť vhodné sú estery – metyl a etyleoleát, glycerolmonooleát, polyetylenglykolmonooleát alebo polyetylenglykoldioleát. Z anorganických odpeňovadiel – silikónový olej. Zdrojom organického dusíka môžu byť rastlinné a živočíšne proteíny a ich hydrolyzáty. Najčastejšie sa používa bavlníková, arašidová, sojová, kukuričná, rybia, kostná múka, resp. kvasničný extrakt a proteínové zbytky po rôznych fermentáciách.

Živná pôda obsahuje tiež anorganické soli zlepšujúce priebeh kultivácie a to: uhličitan vápenatý, borax, octan amónny resp. niektoré fosfáty alkalických kovov.

Veľmi dôležitou súčasťou fermentačnej pôdy je zdroj organickej síry, najčastejšie DL-metionín. Mechanizmus pôsobenia metionínu ide cez metabolickú dráhu cysteinu, ktorý slúži ako priamy prekursor jadra 7-aminocefalosporánovej kyseliny. Súčasne metionín inhibuje tvorbu cystein – degradačných enzýmov, čím dovoľuje udržiavať intracelulárny systém cisteínu na hladine optimálnej pre tvorbu CFS-C. Sterilná produkčná pôda naočkovaná 5–10 obj. % inokula sa kultivuje 96–180 hodín pri teplote 20–30 °C. Vytvorený CFS-C sa stanoví spektrofotometricky podľa Claridge, Vaughan, Kressel a Gourevitch: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1969, 131 alebo mikrobiologickým testom na *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750.

Príklad č. 1

Produkčný kmeň *Acremonium chrysogenum* CCM F-644 sa z pieskovej konzervy naočkuje na šikmý agar nasledovného zloženia:

kvasničný extrakt Difco	0,4 %
kazeínový enzymatický hydrolyzáť	0,3 %
glukóza	1,0 %
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,005 %
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,005 %
DL-metionín	0,005 %

L-cystein	0,005 %
agar Difco	2,5 %

pH po sterilizácii 6,5–6,8, naočkované šikmé agary vysporulujú v inkubátore pri teplote 28 °C za 11 dní. Takto pripravený šikmý agar sa ďalej spláchnie s 10 ml sterilnej H₂O a s 0,3 ml tejto suspenzie sa očkuje 60 ml inokulačnej pôdy (IP) o zložení:

sacharóza	1,5 %
kukuričný výluh 59 %	0,8 %
octan amónny	0,5 %
DL-metionín	0,1 %
metyleoleát	0,08 %

sojový olej 1 kvapka/banička

plnenie 60 ml pôdy do 500 ml varných baniek

pH po 30 minútach sterilizácie pri 120 °C je 6,4–6,8.

Po 72hodinovej kultivácii pri teplote 28 °C na rotačnom trepacom stroji pri 220 obr./min. sa s 5 ml narasteneho vegetatívneho inokula očkujú 300 ml erlenmayerove banky s lúpaným jačmeňom.

Príprava lúpaného jačmeňa: K 500 g lúpaného jačmeňa veľkosť č. 7 pridáme 300 g arašidovej múky a 100 ml Czapek–Dox roztoku o zložení: sacharóza 4 %, kukuričný výluh 100 % 0,5 %, NaNO₃ p. a. 0,3 %, KH₂PO₄ 0,5, MsSO₄ · 7H₂O 0,25 %. pH po 30 minútovej sterilizácii pri 120 °C je 5,7–5,9. Po dobrom premiešaní sa rozplňuje po 30 g do 300 ml erlenmayerových baniek a sterilizuje pri teplote 110 °C 30 minút.

Po 24 hodinách sa sterilizácia opäť zopakuje. Naočkovaný lúpaný jačmeň sa uloží a pri teplote 28 °C nechá sporulovať 11 dní. Vysporulované konzervy sa môžu skladovať pri teplote –15 °C maximálne 3 mesiace. Pri očkovaní inokula sa jačmenná konzerva zaleje s 50 ml sterilnej vody a 2 hodiny sa na trepacom stroji zmývajú spóry. Táto suspenzia postačí na očkovanie 100 l pomnožovacej pôdy (o zložení totožnom s pôdou IP), ktorou sa po 72 hodinách aerobnej kultivácie s 10 % obj. očkuje produkčná pôda nasledujúceho zloženia:

kukuričný škrob	4,5 %
arašidová múka	6,0 %
sacharóza	0,5 %
glukóza	1,25 %
CaCO ₃	1,0 %
DL-metionín	1,7 %
borax	0,05 %
metyleoleát	2,5 %

Sterilizácia pri teplote 120 °C 40 minút. Počiatočné pH 6,3–6,5, kultivácia v nerezovom tančíku o objeme 30 l, vzdušenie 1 obj./obj. pôdy/min., pretlak 0,7 atp, miešanie 500 obr./min., teplota do 24 hodiny kultivácie 28 °C, potom 23 °C do konca kultivácie t. j. 168 hodín, kedy sa dosiahla produkčná aktivita 3800 µg/ml CFS-C.

Príklad č. 2

Pomnožovanie kmeňa, príprava inokula, podmienky kultivácie ako v príklade 1, len miesto kukuričného škrobu v produkčnej pôde sa použilo:

- a) 6 % vodorozpustného škrobu. V 160 hodine kultivácie sa dosiahlo 3950 $\mu\text{g/ml}$
- b) 6 % dextrínu. V 160 hodine kultivácie sa dosiahlo 3450 $\mu\text{g/ml}$
- c) 6 % zemiakového škrobu. V 160 h. k. sa dosiahlo 3850 $\mu\text{g/ml}$.

Príklad č. 3

Pomnožovanie kmeňa, príprava inokula, podmienky kultivácie ako v príklade 1, len miesto 2,5 % metyloleátu sa použilo v produkčnej pôde:

- a) 2,5 % etyloleátu. V 164 h. k. sa dosiahlo 3780 $\mu\text{g/ml}$
- b) 1,5 % glycerolmonooleát a 0,5 % sojového oleja. V 164 h. k. sa dosiahlo 3550 $\mu\text{g/ml}$
- c) 1,5 % polyetylénglykoldioleát a 0,5 % slnečnicového oleja. V 164 h. k. sa dosiahlo 3600 $\mu\text{g/ml}$
- d) 1 % metyloleátu, 0,5 % bravčovej masti a 0,5 % destilátu bravčovej masti – Lard oil. V 164 h. k. sa dosiahlo 3400 $\mu\text{g/ml}$.

Príklad č. 4

Pomnožovanie kmeňa, príprava inokula, podmienky kultivácie ako v príklade 1, len v produkčnej

pôde sa použilo miesto 4,5 % kukuričného škrobu a 0,5 % sacharózy:

kukuričného škrobu	3 %
sacharózy	2 %

po 164 h. k. sa dosiahla produkčná aktivita 3780 $\mu\text{g/ml}$.

Príklad č. 5

Pomnožovanie kmeňa, príprava inokula, podmienky kultivácie ako v príklade 1, len v produkčnej pôde sa miesto 1,7 % DL-metionínu a 0,5 % CaCO_3 použije:

1 % DL-metionínu

1 % CaCO_3

Po 96 hodinách kultivácie sa dosiahla produkčná aktivita 3200 $\mu\text{g/ml}$.

Príklad č. 6

Pomnožovanie kmeňa, príprava inokula, podmienky kultivácie ako v príklade 1, len miesto arašidovej múky sa v produkčnej pôde použije:

2 % arašidovej múky

4 % bavlníkovej múky

Po 140 hodinách kultivácie sa dosiahla produkčná aktivita 3850 $\mu\text{g/ml}$.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob fermentačnej výroby cefalosporínu C vyznačujúci sa tým, že sa produkčný kmeň *Acremonium chrysogenum* CCM F-644 propagovaný striedavou pasážou, pričom prevádzkovou konzervou je kmeň vysporulovaný na lúpanom jačmeni, submerzne aerobne kultivuje vo vysterilizova-

ných živných pôdach pomnožovacích a produkčnej, obsahujúcich ako asimilovateľné zdroje uhlíka polysacharidy, disacharidy, respektive monosacharidy, ďalej zdroje dusíka, síry, anorganické soli, odpeňovadlá a DL-metionín pri kultivačnej teplote 23–30 °C, pH = 6,3 – 7,5 za 168 hodín.