



ÚRAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

**252994**  
(11) (B1)

(22) Prihlásené 13 01 86  
(21) [PV 278-86.V]

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>  
C 12 N 1/20

(40) Zverejnené 12 03 87

(45) Vydané 15 10 88

(75)  
Autor vynálezu

KREMPOVÁ ALŽBETA ing., WELWARD LADISLAV ing.,  
DUDEK MARCEL ing., RAKYTA JÁN ing., POTANČOKOVÁ MARTA,  
BANSKÁ BYSTRICA, KOŠALKO RUDOLF ing. CSc.,  
MARTVOŇ AUGUSTÍN doc. ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Kmeň mikroorganizmu *Trigonopsis variabilis* CCY 15-1-2

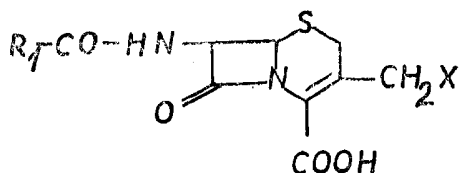
1

2

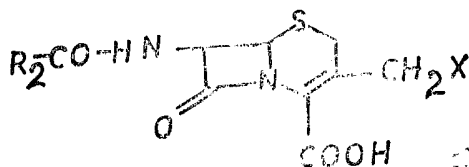
Riešenie sa týka kmeňa *Trigonopsis variabilis* CCY 15-1-2, ktorý je mutantom kmeňa *Trigonopsis variabilis* CCY 15-1-1 a ktorý sa vyznačuje indukčnou syntézou D-aminoacid: Oxidoreduktázy deaminujúcej EC 1-4-3-3, katalyzujúcej oxidatívnu deamináciu zlúčenín všeobecného vzorca 2 (najmä cefalosporín C) na zlúčeniny všeobecného vzorca 1 (najmä kyseliny 7- $\beta$ -(4-karboxybutanamido)cefalosporánovej. Bunky produkčného kmeňa je možné v natívnej alebo imobilizovanej forme použiť na transformáciu najmä cefalosporínu C za vzniku 7-acylamínových zlúčenín, ktoré sú vhodným substrátom pre enzýmovú prípravu kyseliny 7-amfnocefalosporánovej.

Vynález Kmeň mikroorganizmu *Trigonopsis variabilis* CCY 15-1-2 s aktivitou D-aminoacid: O<sub>2</sub>-oxidoreduktázy deaminujúcej EC 1-4-3-3 sa týka kmeňa mikroorganizmu *Trigonopsis variabilis* CCY 15-1-2, použiteľného pre enzýmovú prípravu 7-acyl-aminocefém zlúčenín, najmä pre prípravu kyseliny 7-β-(4-karboxybutánamido)cefalosporánovej, ďalej GLT-7ACK.

Zlúčeniny všeobecného vzorca 1



kde X je —H, —OH, —OCOCH<sub>3</sub> alebo nukleofilná skupina a R<sub>1</sub> je (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>—CHNH, —(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>—CO—COOH, možno pripraviť zo zlúčenín všeobecného vzorca 2



kde R<sub>2</sub> je —(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>—CH NH<sub>2</sub>—COOH, pôsobením enzýmov, katalyzujúcich oxidačnú deamináciu zlúčenín všeobecného vzorca 2. Na enzýmovú reakciu je možné využiť buď izolovaný enzým alebo celé bunky niektorých druhov mikroorganizmov.

Priama hydrolyza zlúčenín všeobecného vzorca 2, kde X je —OCOCH<sub>3</sub> a R je —(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CHNH<sub>2</sub>COOH tzn. cefalosporín C za vzniku kyseliny 7-aminocefalosporánovej (7ACK) je možná, no značne zložitá a pre praktické využitie málo efektívna a často je vznik hlavného produktu sprevádzaný tvorbou sprievodných derivátov najmä kyseliny 3-deacetyl-7-amino-cefalosporánovej. Je opísaná celá rada rôznych mikroorganizmov, produkujúcich acylázy vhodné na konverziu CFS-C na 7ACK- *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Gibberella* *Aspergillus*, *Gliocladium* (JP 77 143 289, Brit. patent. spis 1566830, US pat. 3 239 394, JP 77 038 092) maximálna udávaná konverzia na 7ACK je 15—18 %. V tejto situácii sa javí ďalekoperspektívnejšie dvojstupňová enzýmová transformácia 7-acylamino zlúčenín všeobecného vzorca 2 kde R je —(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>—CNHN<sub>2</sub>COOH na 7-acylamino zlúčeniny všeobecného vzorca 1 kde R je —(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>—COOH. Túto reakciu za použitia rôznych kmeňov napr. *Aspergillus*, *Neurospora*, *Aerobacter*, *Candida*, *Trigonopsis*, *Fusarium*, *Penicillium* opisujú japonské pat.

spisy číslo 80 23 966, 75 038 092, 55 35119, 54 154 592, 50 71 58 alebo britský pat. spis 1 272 769. Chemickú konverziu CFS-C na zlúčeniny všeobecného vzorca č. 1 opisuje jap. pat. spis 78 114 871 alebo 77 77 078. Zlúčeniny všeob. vzorca č. 1 možno transformovať na kyselinu 7-amino-cefalosporánovú enzýmovou hydrolyzou za použitia enzýmov alebo buniek kmeňov *Pseudomonas ovalis*, *Commamonas*, *Arthobacter*, *Bacillus* a i. podľa jap. pat. spisov č. 53 940 93., 76 70 884., 81 85 298., 52 128 293 a iných.

Vynález sa týka kmeňa *Trigonopsis variabilis* CCY 15-1-2, ktorý je mutantom pôvodného kmeňa *Trigonopsis variabilis* CCY 15-1-1 a ktorý sa vyznačuje induktívnu syntézou D-aminoacid: O<sub>2</sub>-oxidoreduktázy, deaminujúcej EC 1-4-3-3 (D-aminoacid oxidázy, DAAox), katalyzujúcej premenu CFS-C (látky všeobecného vzorca č. 2 na látky všeobec. vzorca č. 1, alebo katalyzujúcej premenu D-amínokyselín za vzniku príslušných ketokyselín. Kmeň bol získaný z pôvodného zbierkového kmeňa T. variabilis CCY 15-1-1 mutagenézou fyzikálnymi faktormi. Suspenzia buniek kmeňa, získaná sterom zo šikmej agarovej pôdy, bola po nariadení nanosená na Petriho misky so Saburaudovou pôdou a podrobená mutagénnemu zásahu UV svetlom zo vzdialenosti 50 cm po dobu 1 min. Bol vybraný monokolóniový izolát vykazujúci vysokú aktivitu enzýmu DAAox.

Kmeň je uchovávaný na šikmej agarovej pôde podľa Saburauda a pomnožovaný na pôde zloženia glukóza (2 %), kukuričný extrakt 100 %-ný (2 %) a induktor (0,25 %), ktorým môže byť DL-metionín, D-valín, pH pôdy 5,0. Kultivácia v inokulačnom aj produkčnom stupni je 72-hodinová.

Biochemické charakteristiky kmeňa:

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| 1) Fermentácia cukrov         |   |
| galaktóza                     | + |
| maltóza                       | — |
| laktóza                       | — |
| sacharóza                     | — |
| glukóza                       | + |
| fruktóza                      | + |
| sorbóza                       | + |
| xylóza                        | — |
| dulcít                        | — |
| arabinóza                     | — |
| ribóza                        | — |
| manóza                        | + |
| 2) tvorba lyzín-dekarboxylázy | — |
| 3) tvorba katalázy            | + |
| 4) stekucovanie želatíny      | — |
| 5) redukcia citrátov          | — |
| 6) β-laktamázy                | — |

Množstvo DDA oxidázy v bunkách bolo sledované nepriamo na základe bilancie oxidačnej deaminácie cefalosporínu C za vzniku glutaryl-7ACK metódou vysokotlakovo-

vej kvapalinovej chromatografie alebo chromatografiou na tenkej vrstve.

Použitie kmeňa *Trigonopsis variabilis* pre prípravu GLT-7ACK je dokumentované v nasledovnom praktickom príklade bez toho, že by sa ním jeho použitie obmedzovalo.

#### Príklad 1

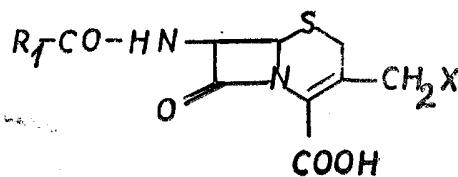
Kmeň *Trigonopsis variabilis* CCY 15-1-2 je naočkovaný do 60 ml živnej pôdy o obsahu 2 % glukózy, 2 % 100%-ného kukuričného extraktu a 0,25 % induktora (D-valínu), pH 5,0 v 500 ml kultivačných baničkách. Po 72-hodinovej kultivácii na rotačnom trepacom stroji pri teplote 27 °C je 5 mililitrov inokula naočkované do pôdy rovnakého zloženia ako inokulačná, len induk-

tor D-valín je nahradený D alebo DL metionínom o koncentrácii 0,3 %. Kultivácia za rovnakých podmienok ako v inokulačnom stupni sa ukončí po 72 hodinách a bunky sa separujú centrifugáciou pri 4 000 ot/min., za chladenia (-5 °C) 20 minút. Špecifická aktivita takto pripravených buniek je určená na základe bilancie oxidačnej deaminácie cefalosporínu C (zlúčenina všeobecného vzorca č. 2) o koncentrácii 10 mg/ml v 0,1 M fosfátovom pufrí pH 8,0 pri 34 °C počas 2-hodinovej konverzie za vzniku GLT-7ACK (látka všeobecného vzorca č. 1), aktivita buniek je 15 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> suchej hmoty. V porovnaní s pôvodným kmeňom *T. variabilis* CCY 15-1-1 za rovnakých podmienok je špecifická aktivita kmeňa *T. variabilis* CCY 15-1-2 vyššia o 30 %.

#### PREDMET VYNÁLEZU

Kmeň mikroorganizmu *Trigonopsis variabilis* CCY 15-1-2 s aktivitou D-aminoacid: Oxidoreduktázy deaminujúcej EC 1-4-3-3,

katalyzujúci oxidačnú deamináciu zlúčenín všeobecného vzorca



kde X je -H, -OH, -OCOCH<sub>3</sub> alebo nukleofilná skupina a R<sub>1</sub> je -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-

-CHNH<sub>2</sub>-COOH, za vzniku zodpovedajúcich 7-acylaminocefém zlúčenín.