



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

201338
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 37/00

(22) Přihlášeno 19 09 78
(21) (PV 6047-78)

(40) Zveřejněno 29 02 80

(45) Vydáno 15 06 82

(75)
Autor vynálezu

MATELOVÁ VLASTA RNDr. CSc., ROZTOKY U PRAHY,
TOSCANIOVÁ EVA ing. CSc. a ČULÍK KAREL RNDr., PRAHA

(54) Způsob výroby penicilinu V

Vynález se týká způsobu výroby penicilinu V kultivací produkčního mikroorganismu *Penicilium chrysogenum* v tekuté živné půdě obsahující zdroj asimilovatelného uhlíku, který se v průběhu kultivace dávkuje a zdroj asimilovatelného dusíku, minerální živné soli a kyselinu fenoxyoctovou jako prekurzor, za submerzních podmínek.

Výtěžnost fermentace a izolace při biosyntetické výrobě penicilinu V je určována poměrem žádaného produktu, tj. penicilinu V, k nežádoucímu vedlejšímu produktu, tj. p-hydroxyderivátu penicilinu V a k obsahu zbytku prekurzoru ve fermentační půdě. Čím více obsahuje fermentační půda na konci fermentace penicilinu V a méně p-hydroxyderivátu penicilinu V a nespotřebovaného prekurzoru, tím je ekonomika biosyntetické výroby penicilinu V včetně izolace příznivější.

Vznik nežádoucího p-hydroxyderivátu penicilinu V transformací penicilinu V produkčním mikroorganismem v průběhu fermentace byl vyloučen uspořádáním modelových pokusů, při kterých byla do fermentační půdy, která neobsahovala žádný prekurzor, přidávána substance penicilinu V v různé koncentraci a v různé době fermentace. V průběhu fermentace, vedené při teplotě 25 °C po dobu 10 dnů, byla sledována skladba penicilinů a bylo zjištěno, že obsah penicilinu V je kon-

stantní a že jeho p-hydroxyderivát nevzniká.

Z výsledků těchto pokusů je zřejmé, že nežádoucí p-hydroxyderivát penicilinu V se tvoří v průběhu fermentace tak, že prekurzor penicilinu V, tj. kyselina fenoxyoctová, je transformován nejprve v prekurzor p-hydroxyderivátu penicilinu V, ze kterého teprve další biochemickou reakcí vzniká p-hydroxyderivát penicilinu V.

Při celkové analýze fermentačního procesu byl detailně sledován obsah penicilinu V a jeho p-hydroxyderivátu, kyseliny fenoxyoctové a p-hydroxyfenoxyoctové, a to v průběhu celé fermentace, kdy buď celé množství prekurzoru bylo přítomno v mediu již v 0. hodině fermentace nebo kdy byl prekurzor dávkován v různých množstvích v různých stadiích fermentace. Za těchto podmínek lze podle vzniku p-hydroxyderivátu penicilinu V usuzovat na spojitost s autolýzou kultury nebo na deficit substrátu vhodného k oxidaci po ukončení dávkování sacharosy. Při standardním postupu se totiž sacharóza nepřidává až do konce fermentace, její dávkování se zastaví při prvním zjištěném maximu produkční fáze. Byly proto provedeny další pokusy, ve kterých byla autolýza záměrně podpořena předčasným zastavením dávkování sacharosy a naopak, prodloužením doby dávkování sacharosy byl pro kulturu zajištěn oxidovatelný substrát.

Ze získaných výsledků vyplynulo, že obsah p-hydroxyderivátu penicilinu V lze ve fermentační půdě regulovat dávkováním sacharózy. Byl totiž objeven vztah, že čím je v průběhu fermentace sacharóza déle dávkována, tím méně p-hydroxyderivátu penicilinu V vzniká ve fermentační půdě.

Na základě těchto poznatků byl vypracován způsob výroby penicilinu V kultivací produkčního mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* v tekuté živné půdě obsahující zdroj asimilovatelného uhlíku, který se v průběhu kultivace dává a zdroj asimilovatelného dusíku, minerální živné soli a kyselinu fenoxycetovou jako prekursor, za submerzních podmínek, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se zdroj asimilovatelného uhlíku dává do fermentační půdy až do ukončení růstové fáze mikroorganismu, v následující produkční fázi se dávky zdroje asimilovatelného uhlíku snižují na množství potřebné k udržení kultury, načež se po začínajícím zvyšování obsahu p-hydroxyderivátu penicilinu V v půdě obnoví dávkování zdroje asimilovatelného uhlíku jako v růstové fázi, přičemž poslední dávka se přidává 12 až 24 hodin před ukončením produkční fáze.

Uvedeným jednoduchým opatřením se podařilo účinně zlepšit průběh fermentační výroby penicilinu V a snížit na únosnou míru jednak obsah nežádoucího vedlejšího produktu, tj. p-hydroxyderivátu, jednak obsah nepotřebovaného prekursoru. Tím se rovněž zjednodušuje izolace penicilinu V a zlepšuje jeho kvalita.

Následující příklady provedení způsobu podle vynálezu pouze ilustrují, ale nijak neomezuji.

Příklad 1

Fermentace v laboratorním měřítku byla provedena s produkčním mikroorganismem *Penicillium chrysogenum* ve varných baňkách na rotačním třepacím stroji. Inokulum bylo připraveno standardním postupem na půdě obsahující kukuřiční extrakt, sacharosu a živné sole, v produkční fázi byla použita půda obsahující sojovou mouku, prekursor, křidu a zdroj síry. Jako zdroj uhlíku sloužila sacharóza, která byla průběžně dávkována do 4. nebo 8. dne fermentace. Závislost vzniku p-hydroxyderivátu penicilinu V na dávkování sacharózy je uvedena v tabulce 1.

Tabulka 1

Dny fermentace	Sacharóza dávkována do			
	4. dne fermentace		8. dne fermentace	
	p-hydroxyderivát mg/ml	prekursor mg/ml	p-hydroxyderivát mg/ml	prekursor mg/ml
7.	1,1	2,9	1,0	3,0
8.	1,2	2,1	0,9	2,0
9.	1,3	1,8	0,7	1,4
10.	1,6	1,7	0,6	1,2
11.	1,9	1,5	0,5	0,6

Prodlouží-li se doba dávkování sacharózy, dosáhne se příznivého poměru penicilinu V k jeho p-hydroxyderivátu a zbytku prekursoru. Obsah p-hydroxyderivátu penicilinu V není vyšší než 0,5 mg/ml, obsah kyseliny fenoxycetové nepřesahuje koncentraci 0,6 mg/ml.

Příklad 2

Fermentace ve 20 litrových fermentačních tancích byla provedena s produkčním mikroorganismem *Penicillium chrysogenum*. Inokulum bylo připraveno na půdě obsahující kukuřičný extrakt, sacharózu a živné sole nebo sojovou mouku, sacharózu a sole. Fermentační půda obsahovala sojovou mouku, prekursor, křidu a zdroj síry. Sacharóza byla průběžně dávkována buď do 100. hodiny nebo až do konce fermentace, tj. do 160. hodiny. Závislost vzniku p-hydroxyderivátu penicilinu V na dávkování sacharózy je uvedena v tabulce 2.

Tabulka 2

Dny fermentace	Sacharóza dávkována do			
	100. hod.		160. hod.	
	p-hydroxyderivát mg/ml	prekursor mg/ml	p-hydroxyderivát mg/ml	prekursor mg/ml
25	0,1	6,3	0,1	5,8
53	0,2	5,8	0,2	5,0
75	0,3	4,3	0,2	4,3
100	0,6	3,3	0,5	3,1
125	0,7	2,5	0,6	2,2
150	1,2	2,5	0,6	1,8
164	1,2	2,4	0,6	0,9

Při dávkování sacharózy v průběhu celé fermentace je po jejím ukončení obsah p-hydroxyderivátu penicilinu V 0,6 mg/ml a obsah nepotřebovaného prekursoru nižší než 1 mg/ml.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby penicilinu V kultivací produkčního mikroorganismu *Penicillium chrysogenum* v tekuté živné půdě obsahující zdroj asimilovatelného uhlíku, který se v průběhu

kultivace dává a zdroj asimilovatelného dusíku, minerální živné soli a kyselinu fenoxycetovou jako prekursor, za submerzních podmínek, vyznačující se tím, že se zdroj asi-

milovatelného uhlíku dávkuje do fermentační pudy až do ukončení růstové fáze mikroorganismu, v následující produkční fázi se dávky zdroje asimilovatelného uhlíku sníží na množství potřebné k udržení kultury, načež se po začínajícím zvyšování obsahu p-hydroxyderi-

vátu penicilinu V v půdě obnoví dávkování zdroje asimilovatelného uhlíku jako v růstové fázi, přičemž poslední dávka se přidává 12 až 24 hodin před ukončením produkční fáze.