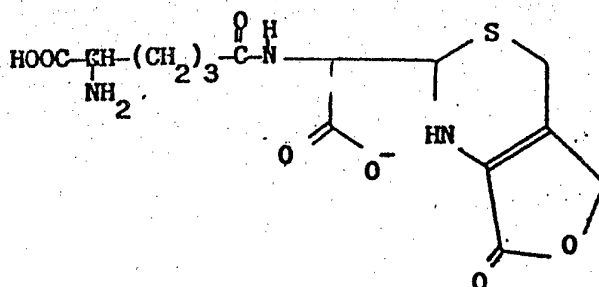


(19)

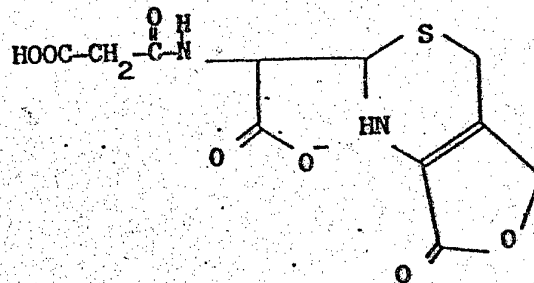
(10) **LT 3122 B**(12) **PATENTO APRAŠYMAS**(11) Patent numeris: **3122**(51) Int.Cl.⁵: **C12N 1/14**
C12P 35/06
C07D 419/14(21) Paraiškos numeris: **IP499**(22) Paraiškos padavimo data: **1993 04 29**(41) Paraiškos paskelbimo data: **1994 07 15**(45) Patent paskelbimo data: **1994 12 25**(31,32,33) Prioritetas: **01381/92-9, 1992 04 29, CH**(72) Išradėjas:
Sabine Schurr, DE
Andreas Tschech, CH(73) Patent savininkas:
LONZA AG, Gampel/Wallis, Geschäftsleitung, 4002 Basel, CH(74) Patentinis patikėtinis:
Liudmila Gerasimovič, 9, J.Basanavičiaus g. 16/5-41, 2009 Vilnius, LT(54) Pavadinimas:
Mikrobiologinis būdas malonil-7-aminocēfalosporano rūgšties darinams gauti

(57) Referatas:

Aprašyti nauji mikroorganizmai, atrinkti selekcijos būdu taip, kad jie, panaudodami laktoną arba jo tirpias druskas, kurių formulė

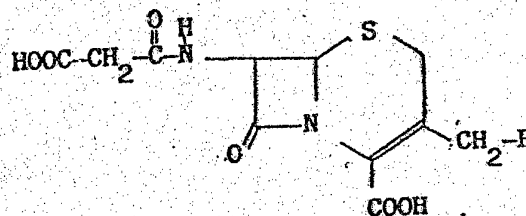


kaip vieningą anglies, azoto ir energijos šaltinį, gali jį paversti laktoną arba jo tirpias druskas, turinčius formulę



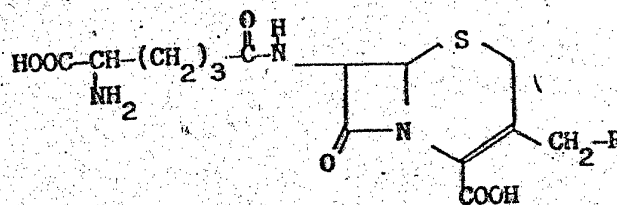
II

ir pastarąjį nekatabolizuoti. Toliau aprašytas mikrobiologinis malonil-7-aminocefalosporano rūgšties darinių arba jų tirpių druskų, turinčių bendrą formulę



III

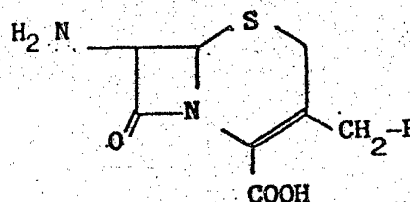
gamybos būdas, panaudojant šiuos mikroorganizmus ir cefalosporino C darinius arba jų tirpias druskas, kurių bendra formulė



IV

kaip pradinės medžiagos.

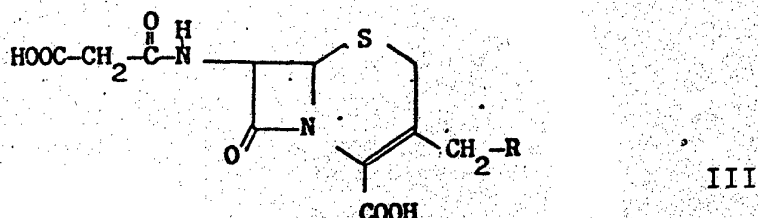
Toliau aprašytas naujas 7-aminocefalosporano rūgšties darinių arba jų tirpių druskų, turinčių bendrą formulę



V

gamybos būdas, kai pradinė medžiaga yra malonil-7-aminocefalosporano rūgšties dariniai.

Išradime aprašomi nauji malonil-7-aminocefalosporano rūgšties dariniai arba jų tirpios druskos, turintys formulę



10 kurioje, R yra vandenilis, hidroksilas arba acetoksigrupė, naujas jų gamybos būdas, kai pradinė medžiaga yra atitinkami cefalosporino C dariniai, o
15 taip pat nauji šiam būdai tinkami mikroorganizmai.

Be to, išradime aprašomas naujas mikrobiologinis 7-aminocefalosporano rūgšties darinių gamybos būdas, pradedant nuo malonil-7-aminocefalosporano rūgšties
20 darinių, taip pat naujas Pseudomonas sp. (DCM 7509) genties mikroorganizmų panaudojimas.

Tolesniame aprašyme pavadinimai malonil-7-aminocefalosporano rūgšties dariniai (formulė III), cefalosporino
25 C dariniai (formulė IV), malonil-laktonas (formulė II) ir laktonas (formulė I) apima ir šių junginių tirprias druskas, tokias kaip amonio arba šarminių metalų druskas.

30 Malonil-7-aminocefalosporano rūgšties dariniai gali būti, pavyzdžiui, pradinė medžiaga sintetinant 7-aminocefalosporano rūgšties darinius, kurie vėlgi yra svarbios pradinės medžiagos cefalosporininių antibiotikų gamyboje (J. Bacteriol., 1987, vol. 169,
35 Nr. 12, 5815-5820).

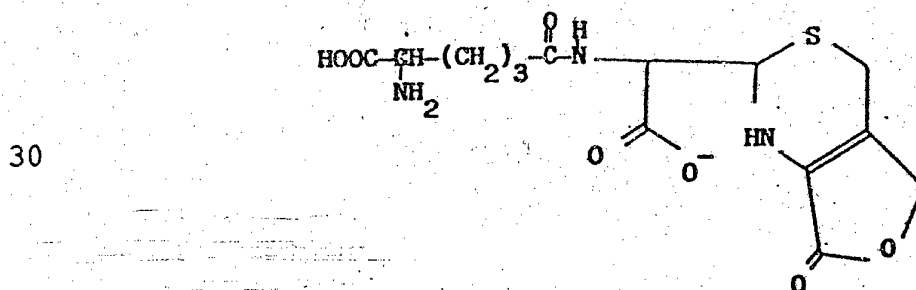
Iki šiol nebuvo žinomi nei cheminiai, nei mikrobiologiniai malonil-7-aminocefalosporano rūgšties darinių gamybos būdai.

5 7-Aminocefalosporano rūgšties darinių sintezei yra daug mikrobiologinių metodų, kuriuose pradine medžiaga yra cefalosporinas C, aprašytų, pavyzdžiui, JP-A 62 48380. Visų šių metodų trūkumas yra tai, kad jie negali būti pritaikyti pramonėje.

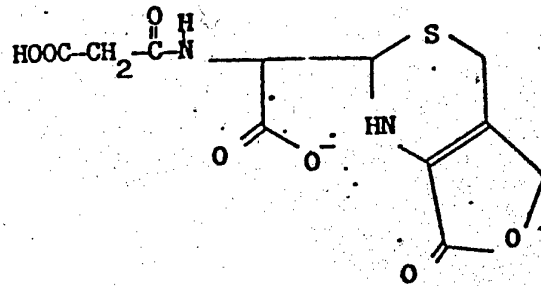
10 Išradimo tikslas buvo sukurti, panaudojant naujus mikroorganizmus, naują paprastą ir ekonomišką mikrobiologinį naujų malonil-7-aminocefalosporano rūgšties darinių gamybos būdą. Kitas uždavinys buvo, panaudojant
15 šiuos darinius, sukurti naują mikrobiologinį 7-aminocefalosporano rūgšties darinių gamybos būdą.

Išradimo tikslas buvo pasiektas pateikus naujus mikroorganizmus pagal išradimo apibrėžties 1 punktą,
20 naują būdą pagal išradimo apibrėžties 3 punktą, naujus malonil-7-aminocefalosporano rūgšties darinius pagal 8 punktą ir naują būdą pagal 10 punktą.

Išradime aprašomi mikroorganizmai yra atrinkti
25 selekcijos būdu taip, kad jie gali laktoną, turinti formulę



35 panaudodami kaip vienintelį anglies, azoto ir energijos šaltinį, paversti laktonu, turinčiu formulę



5

II

ir pastarąjį nekatabolizuoti.

10

Šie mikroorganizmai selekcionuojami naudojant laktoną, turintį formulę I, bei pasitelkiant tradicinius mikrobiologinius metodus, pavyzdžiui, analizuojant įvairius dirvožemio pavyzdžius. Kai mikroorganizmai iš dirvožemio pavyzdžių auginami kaip inokuliatas ant laktono, turinčio formulę I, gaunami mikroorganizmai, galintys augti panaudodami šį laktoną kaip vienintelį anglies, azoto ir energijos šaltinį. Iš šių mikroorganizmų specialistams žinomais metodais atrenkami mikroorganizmai, kurie paverčia laktoną, turintį formulę I, malonilo laktonu, turinčiu formulę I ir nekatabolizuoja pastarojo.

20

Selekcijai reikalingą laktoną, turintį formulę I, galima susintetinti iš komercinio dezacetilcefalosporino C. Iš pradžių dezacetilcefalosporinas C žinomais metodais (Jefferay et al., Biochem J. 1961, 81, 591) laktonizuojamas iki atitinkamo laktono. Norint gauti pageidaujamą laktoną, turintį perkirstą laktaminį žiedą (formulę I), laktaminis žiedas specialiai skaldomas, pavyzdžiui, penicilinaze.

30

Iš esmės tinka visi mikroorganizmai, gaunami selekcinio dauginimu. Šie mikroorganizmai literatūroje neaprašyti ir yra šio išradimo dalis.

35

Selekcionuojant gauti mikroorganizmai, kurie žymimi FB1 (DSM 7007), jų mutantai ir palikuonys. Jie yra 1992.03.25 deponuoti firmoje Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-3300 Braunschweig.

Šie mikroorganizmai, padavus paraišką dėl prioriteto, buvo analizuojami 16 S.RNA metodu ir nustatyta, kad jie priklauso Sphingomonas sp. genčiai.

10

Mokslinis Sphingomonas sp. FB1 (DSM 7007) aprašymas:

Ląstelių forma	mažytės ląstelės
Plotis, μm	0.4-0.6
Ilgis, μm	0.8-1.5
Judrumas	+
Ūseliai	poliarinis 1
Gram-reakcija	-
Lizavimas 3% KOH	+
Amino-peptidazė (Cerny)	+
Sporos	-
Ūksidazė	+
Katalazė	+

15 Pagrindinis chinoninis komponentas: Ubichinonas Q10

DNR sudėtis HPLC metodu: 63 mol% G+C.

Paprastai selekcija ir auginimas vyksta mineralinių druskų terpėje, labiau tinka mineralinių druskų terpė, kurios sudėtis pateikta Lentelėje 1 (a ir b). Mikroorganizmų auginimui gali būti panaudotos ir kitos terpės, pavyzdžiui, komercinės pilnos terpės.

25 Auginant ir selekcionuojant tikslinga į mineralinių druskų terpę įdėti nuo 0.2 iki 1 svorio %, labiau

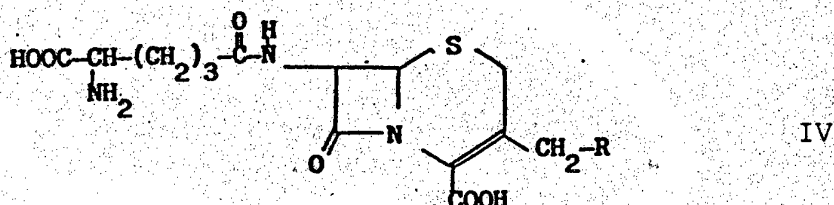
tinkamas kiekis nuo 0.3 iki 0.6 svorio%, laktono, turinčio formulę I.

Temperatūra auginimo ir selekcijos metu palaikoma tarp 0 ir 60°C, labiau tinka temperatūra nuo 20 iki 40°C.

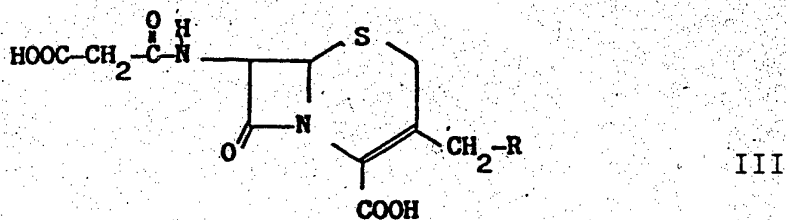
Selekcija ir auginimas vyksta esant pH nuo 5 iki 9, labiau tinka pH nuo 6 iki 8.

Kai optinis tankis prie 650 nm reikšmės (OD_{650}) pasiekia reikšmės nuo 0.1 iki 1, mikroorganizmai surenkami specialistams žinomais metodais ir panaudojami šiame išradime aprašytame metode.

Pagal šį išradimą tokiu būdu selekcionuoti mikroorganizmai panaudojami šiame išradime aprašytame metode cefalosporino C darinių kaip substratų, turinčių bendrą formulę



25 kai R yra vandenilis, hidroksilo grupė arba acetoksigrupė, pavertimui į malonil-7-aminocefalosporano rūgšties darinius, turinčius bendrą formulę



35

kai R reikšmės apibrėžtos aukščiau.

Tikslinga šiame metode naudoti selekcionuotus mikroorganizmus Sphingomonas sp. (DSM 7007). arba jų palikuonis ir mutantus, kurie, kaip jau minėta, yra deponuoti.

5

Paprastai šiame procese specialistams žinomais būdais naudojamos neaugančios ląstelės.

10 Substratais naudojami cefalosporino C dariniai, turintys bendrą formulę IV, kai R reikšmės apibrėžtos aukščiau. Tinkamas substratas yra cefalosporinas C (kai R bendroje formulėje III = acetoksi).

15 Substratas proceso metu įdedamas vienu kartu arba nuolatos. Labiau tinka substratą pridėti taip, kad substrato koncentracija kultūrinėje terpėje neviršytų 20 svorio %, dar geriau jei koncentracija neviršys 4 svorio %.

20 Procesui gali būti panaudotos specialistams įprastos terpės. Labiau tinka procesui žemo molingumo HEPES buferis [4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etansulfoninė rūgštis].

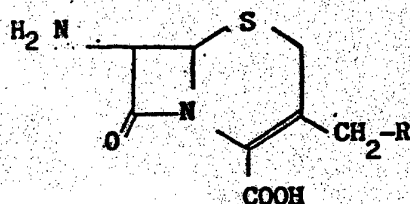
25 Paprastai šiuo metodu dirbama su suspensijomis, kurių optinis tankis OD_{650} siekia nuo 1 iki 100, labiau tinka OD_{650} reikšmė nuo 2 iki 50.

30 Procesui tinkama temperatūra yra nuo 0 iki 60°C, labiau tinkama temperatūra yra nuo 20 iki 40°C, pH reikšmės nuo 5 iki 9, labiau tinka pH reikšmės nuo 6 iki 8.

35 Pasibaigus reakcijai, kurios trukmė yra nuo 1 iki 24 valandų, galima specialistams žinomais metodais išskirti iki šiol neaprašytus malonil-7-aminocefalosporano rūgšties darinius, turinčius formulę III. Ypač tinkamas malonil-7-aminocefalosporano rūgšties darinių atstovas

yra malonil-7-aminocefalosporano rūgštis (kai R bendroje formulėje III = acetoksi).

Šio išradimo būdas, skirtas gaminti 7-aminocefalosporano rūgšties darinius, turinčius bendrą formulę



V,

kurios R reikšmės apibrėžtos aukščiau, vykdomas taip, kad malonil-7-aminocefalosporano rūgšties dariniai arba jų tirpios druskos, turintys bendrą formulę III, Pseudomonas sp. (DSM 7509) genties mikroorganizmų arba jų palikuonių arba mutantų, arba veikiant fermentais be ląstelių, išskirtais iš šių mikroorganizmų, paverčiami produktais, turinčiais formulę V.

Mikroorganizmai Pseudomonas sp. (DSM 7509) yra 1992.03.5 deponuoti firmoje Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-3300 Braunschweig.

Šie mikroorganizmai yra žinomi ir aprašyti JP-A 62 483 80 kaip Pseudomonas sp. SE-495 (FERMBP-818). Pagal JP-A 62 483 80 šie mikroorganizmai atrinkti taip, kad jie hidrolizuotų glutaril-7-aminocefalosporano rūgštį į 7-aminocefalosporano rūgštį. Šių mikroorganizmų panaudojimas malonil-7-aminocefalosporano rūgšties hidrolizei nėra aprašytas.

Todėl šis išradimas aprašo ir šių mikroorganizmų panaudojimą malonil-7-aminocefalosporano rūgšties darinių (formulė V), ypač malonil-7-aminocefalosporano rūgšties (R = acetoksi-), hidrolizei.

Procesas vykdomas su padidinto pralaidumo mikroorganizmų ląstelėmis arba ląstelių homogenizatu, ypač tinka ląstelių homogenizatas.

- 5 Ląstelių homogenizato gaminimui tinka specialistams žinomi metodai, pavyzdžiui, ardymas ultragarsu arba "French-press" tipo aparatai.

- 10 Substratu gali būti malonil-7-aminocefalosporano rūgšties dariniai, turintys formulę V, kai R reikšmės apibrėžtos aukščiau. Tikslinga substratu vartoti malonil-7- aminocefalosporano rūgštį (R = acetoksi-).

- 15 Substratas proceso metu gali būti įdedamas vienu kartu arba nuolatos taip, kad substrato koncentracija kultūrinėje terpėje neviršytų 10 svorio %, dar geriau jei koncentracija neviršys 2 svorio %.

- 20 Procesui gali būti panaudotos specialistams įprastos maitinančios terpės.

Jei procesas vykdomas su ląstelių homogenizatu, baltymo koncentracija šiame ekstrakte yra nuo 0.1 iki 20 g/l, labiau tinka koncentracija nuo 1 iki 5 g/l.

25

Procesą tikslinga vykdyti esant temperatūrai nuo 4 iki 50°C, labiau tinka temperatūra nuo 20 iki 35°C, ir pH nuo 4 iki 9, labiau tinka pH reikšmės nuo 7 iki 8.

- 30 Pasibaigus reakcijai, kurios trukmė nuo 3 iki 24 valandų, galima išskirti 7-aminocefalosporano rūgšties darinius, turinčius formulę V.

Pavyzdys 1:

35

Mikroorganizmų išskyrimas

I 100 ml mineralinių druskų terpės (Lentelė 1), pH 7, kurioje yra 5 mmol (0.5 mmol/100 ml) laktono, turinčio suskaldytą laktaminį žiedą (formulė I), pridedami kaip inokuliatai įvairūs dirvožemio pavyzdžiai, surinkti 5 Visp miesto (Šveicarija) apylinkėse ir inkubuojami purtyklėje su 140 rpm (apsisukimų per minutę), esant 25°C. Kultūros persėjamos 4 kartus į šviežią mineralinių druskų terpę ir laktono pakitimai tikrinami analitinės aukšto slėgio skysčio chromatografijos 10 (ASSC) metodais.

Po to šios kultūros inhibuojamos mineralinių druskų terpės ir agaro lėkštelėse, kur yra 5 mmol laktono (formulė I) esant 25°C. Pagaliau buvo išskirtas 15 bakterijų kamienas Sphingomonas sp. FB1 (DSM 7007), kuris augimo metu laktoną paverčia malonilo laktonu, turinčiu formulę II, ir pastarojo toliau nesuskaldo.

Pavyzdys 2:

20

Malonil-7-aminocefalosporano rūgšties (formulė III) sintezė

Mikroorganizmai Sphingomonas sp. FB1 (DSM 7007) 25 auginami 4 dienas mineralinių druskų terpėje, pH 7.0 (Lentelė Ib), kur yra 5 mmol laktono (formulė I) iki $OD_{650} = 0.44$. (Po pirmų dviejų dienų pridedama papildomas kiekis laktono, tiek, kad jė visa koncentracija siektų 1 mmol laktono 100 ml terpės). Po to lėkštelės 30 nucentrifuguojamos ir lėstelių pasta resuspenduojama 20 ml 10mmol HEPES buferio, pH 7.0 palaikant optinį tankį $OD_{650} = 2.2$. Į tokią lėstelių suspensiją pridedama 0.4 mmol cefalosporino C (formulė IV).

35 Inkubuojama purtant (140 rpm), temperatūra 25°C.

Po 30 min. 60 min. 2.25 val, 5.0 val ir 24 val terpės pavyzdys analizuojamas ASSC.

5 Malonil-7-aminocefalosporano rūgšties sintezės greitis praėjus 2.25 val sudarė 410 mg/1/val/OD₆₅₀.

Po 5 valandų analizė parodė, kad susidaro 142 mg malonil-7-aminocefalosporano rūgšties - tai reiškia, kad sureagavo 99 % cefalosporino C.

10

Malonil-7-aminocefalosporano rūgštį galima išskirti preparatyvinės ASSC metodais, išeiga 40 %.

Pavyzdys 3:

15

Malonil-7-aminocefalosporano rūgšties (formulė III) identifikavimas

20 Norint identifikuoti produktą (formulė III) 500 ml mineralinių druskų terpės (Lentelė I), pH 7.0, sumaišoma su laktonu, turinčiu formulę I taip, kad jo galutinė koncentracija sudarytų 5 mmol. Po to tirpalas inokuliuojamas ankstesne kultūra, kurios OD₆₅₀ = 0.5, palaikant 25°C ir 140 rpm. Praėjus dienai pridama dar 25 5 mmol laktono (formulė I) skaičiuojant 500 ml terpės. Kai OD₆₅₀ pasiekia 0.5 ląstelės surenkamos. Po to ląstelių pasta resuspenduojama 30 ml 10mmol HEPES buferio, pH 7.0, kuriame yra 0.6 mmol cefalosporino C (formulė IV). Po 5 val inkubacijos esant 25°C ir 140 30 rpm, ląstelės centrifuguojamos ir iš supernatanto preparatyvinės ASSC metodais išskiriama malonil-7-aminocefalosporano rūgštis. Išgryninti pavyzdžiai liofilizuojami per naktį ir liofilizatas analizuojamas BMR (¹H ir ¹³C) metodais.

35

Lyginant su cheminiais būdais susintetintu palyginamuoju preparatu (pagamintu iš 7-

aminocefalosporano rūgšties pagal Bull. Soc. Chem. Belg., 1977, 86, 991-1002), įrodomas malonil-7-aminocefalosporano rūgšties susidarymas.

- 5 Malonil-7-aminocefalosporano rūgšties natrio druska (cheminis standartas).

¹³C-BMR (DMSO, 100,5 MHz, cheminiai poslinkiai, m.d.:

- 10 20, s; 25, s; 40, m; 58, d; 64, s; 112, s; 134, s; 164, d; 170, t.

Malonil-7-aminocefalosporano rūgštis (pagal šį išradimą)

15

¹³C-BMR (DMSO, 100,5 MHz, cheminiai poslinkiai, m.d.:

20, 2; 25, s; 40, m; 58, d; 64, s; 112, s; 134, s; 164, d; 170, t.

20

¹H-BMR (cheminis standartas, DMSO, 400 MHz, cheminiai poslinkiai, m.d.):

20, s; 2.5, s; 3.0, t; 3.5 m; 4.8, d; 5.0, d; 5.6 d.

25

¹H-BMR (pagal šį išradimą):

20, s; 2.5, s; 3.0, t; 3.5 m; 4.8, d; 5.0, d; 5.6 d.

30

Pavyzdys 4:

Dezacetilcefalosporino laktonizavimas

Dezacetilfalosporino C laktonas buvo susintetintas iš
35 dezacetilfalosporino C (Ciba-Geigy, Basel) taip:

100 g dezacetilcefalosporino C ištirpinama 1 litre 20 mmol natrio fosfatinio buferio, pH 7.0. Į šį tirpalą pridedama jonų mainų dervos (DOWEX 50X8 (Fluka) (H+ forma), kol pasiekiami pH 2.5. Maišoma 10 min, (250 rpm, kambario temperatūra), po to derva nufiltruojama ir tirpalo pH koreguojamas koncentruota druskos rūgštimi iki 0.8. Maišoma 1 valandą, po to į reakcijos tirpalą pridedama DOWEX 1X8 (Fluka) (acetatinė forma), kol pasiekiami pH 3.0 - 3.2.

Po to maišoma kambario temperatūroje dar 1.5 valandos esant 250 rpm ir derva nufiltruojama. Vėl pridedama DOWEX 1X8 (acetatinė forma), kol pasiekiami pH 3.3 - 3.5, Maišoma 1 valandą, (250 rpm, kambario temperatūra), po to derva nufiltruojama. Reakcijos mišinys rotaciniame garintuve nugarinamas iki sausumo (30 mbar, 30°C). Siekiant pašalinti dar likusią acto rūgštį produktas po išgarinimo tirpinamas vandenyje taip, kad būtų gautas 35 % tirpalas, kurio pH koreguojamas koncentruota druskos rūgštimi iki 1.5.

Taip paruoštas tirpalas ekstrahuojamas du kartus etilo acetatu, kurio tūris lygus tirpalo tūriui. Vandeninės fazės apjungiamos, pH koreguojamas 3 M kalio šarmu iki 3.5, ir nugarinama rotaciniu garintuvu (30 mbar, 30°C). Po to produktas visiškai išdžiovinamas vakuuminėje džiovinimo spintoje (30 mbar, 20°C).

Bendra išeiga sudaro 60 g, skaičiuojant nuo 100 g dezacetilcefalosporino C.

Pavyzdys 5:

Laktono su perkirstu laktaminiu žiedu (formulė I) sintezė

Norint susintetinti laktoną (formulė I), dezacetil-
cefalosporino C laktonas veikiamas beta-laktamaze,
penicilinaze E.C.3.5.2.6. (Sigma) tirpale 6 (lentelė
Ia). Reakcija prasideda iškart pridėjus penicilinazę.
5 Reakcijos metu pH palaikomas 7.0 pridedant 1 N NaOH
tirpalą. Reakcija pasibaigia, kai pH 7.0 nepridedant
NaOH nebekinta. Pasibaigus reakcijai (maždaug 2 val)
tirpalas steriliai filtruojamas (0.2 μ m filtras) ir
laikomas -80°C .

10

Pavyzdys 6:7-Aminocefalosporano rūgšties (formulė V) sintezė

- 15 Mikroorganizmai Pseudomonas sp. SE-495 (DSM 7509;
FERMBP-818) auginami per naktį terpėje (pH 7.0), kuri
sudaryta iš 0.2% (svoris/tūris) mielių ekstrakto, 0,5%
(svoris/tūris) peptono, 0.5% (svoris/tūris) natrio
glutamato ir 0.005 % (svoris/tūris), magnio sulfato,
20 esant 30°C . Šios kultūros persėjamos į šviežią
maitinančią tokios pat sudėties terpę (pasėjamosios
kultūros kiekis siekia 10 %) ir inkubuojama nuo 2 iki 4
dienų.
- 25 Po to ląstelės surenkamos centrifuguojant (20 min 600
rpm), resuspenduojamos 0.1 M kalio fosfato buferyje ir
recentrifuguojamos (viso 3 kartus su 10% kultūros
tūrio). Po to ląstelių pasta resuspenduojama minima-
liame kiekyje kalio fosfato buferio ir apgarsinama
30 šaldant ledu (10 kartų po 30 sek,; pertrauka 20 sek).
Iš tokio homogenizato centrifugavimu (20 min, min. 20
000 apsis./min. atskiriamos ląstelių nuolaužos.

- 35 Siekiant susintetinti 7-aminocefalosporano rūgštį šis
ekstraktas (baltymo koncentracija 2 mg/ml) šildomas iki
kambario temperatūros ir po to pridedama malonil-7-
aminocefalosporano rūgšties, ištirpintos kalio fosfato

buferyje, koncentracija 5 mmol. Visas tirpalas inkubuojamas 25°C nemaišant ir 24 val bėgyje analizuojamas 7-aminocefalosporano rūgštis susidarymas.

- 5 Analizė atliekama plonasluoksnės chromatografijos meto-
dais (plokštelė: silikagelis 60F²⁴⁵, nešėjas: butanolis-
metanolis-acto rūgštis-vanduo santykiu 50:30:3:17). 7-
Aminocefalosporano rūgštis (Rf 0.51) susidarymas iš
malonil-7-aminocefalosporano rūgštis (Rf 0.43) gali
10 būti įrodomas pagal UV-absorbiciją esant nm bangos
ilgiui arba nupurškus plokštelę Fluram-reagentu (3 mg
Fluram; Fluka CH-9470 Buchs, ištirpinti 10 ml acetono)
pagal UV-absorbiciją, esant 366 nm bangos ilgiui.
- 15 Po maždaug 14 val šiame ekstrakte, kurio sudėtyje yra
malonil-7-aminocefalosporano rūgštis acilazė, galima
aptikti nuo 50 iki 100 molio 7-aminocefalosporano
rūgštis.

20 Lentelė 1

a) Mineralinių druskų terpės tirpalai

Tirpalas 1:

25

NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	156.0 g
NH ₄ Cl	10.0 g
K ₂ SO ₄	1.2 g

Dist. vanduo 500 ml

Tirpalas 2:

p-Aminobenzoinė rūgštis	8.0 mg
D-Biotinas	2.0 mg
Nikotino rūgštis	20.0 mg

15

Ca-D-pantotenatas	10.0 mg
Piridoksalhidrochloridas	30.0 mg
Tiamindichloridas	20.0 mg
Ciankobalaminas	<u>10.0 mg</u>

Dist. vanduo 100.0 ml steriliai filtruoti

Tirpalas 3:

HCl (37%)	7.0 ml
FeCl ₂ 4H ₂ O	1.5 g
ZnCl ₂	0.07 g
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.1 g
H ₃ BO ₃	0.006 g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.19 g
CuCl ₂ 7H ₂ O	0.002 g
NiCl ₂ 6H ₂ O	0,024 g
NaMoO ₄	<u>0.036 g</u>

5

Dist. vanduo 1000.0 ml, autoklavuoti,
121°C, 20 min

Tirpalas 4:

NaOH	0.5 g
Na ₂ SeO ₃ 5H ₂ O	0.003 g
Na ₂ WO ₄ 2H ₂ O	<u>0.004 g</u>

Dist. vanduo 1000.0, autoklavuoti, 121°C,
20 min

10

Tirpalas 5:

MgCl ₂ 6H ₂ O	40.0 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	<u>5.0 g</u>

Dist. vanduo 200.0 ml, autoklavuoti,
121°C, 20 min

15

Tirpalas 6:

Dezacetilcefalosporino C laktonas	3.55 g
Dist. vanduo	60.0 ml
Penicilinazė (E.C.3.5.2.6) (Sigma PO389)	1.0 MG (25000 U)
pH koreguojama NaOH iki	<u>7.0</u>
Dist. vanduo iki	100.0 ml

5 b) Mineralinių druskų terpės ir paruošimas

Tirpalas: 25 ml

pH koreguojama KOH iki 7.0, po to pripilti
dist. vandens iki
950.0 ml, autoklavuoti
121°C, 20 min

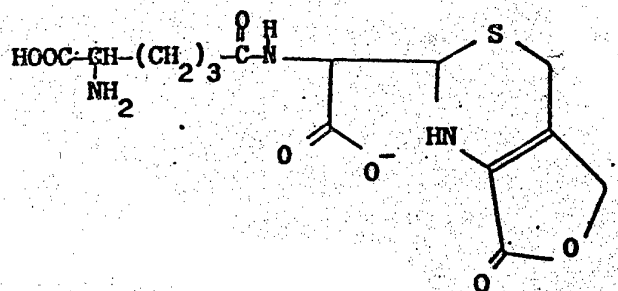
Po sterilizavimo pridėti:

10

Tirpalo 2	0.5 ml
Tirpalo 3	1.0 ml
Tirpalo 4	1.0 ml
Tirpalo 5	0.5 ml
Tirpalas pagal Pavyzdį 5	50.0 ml

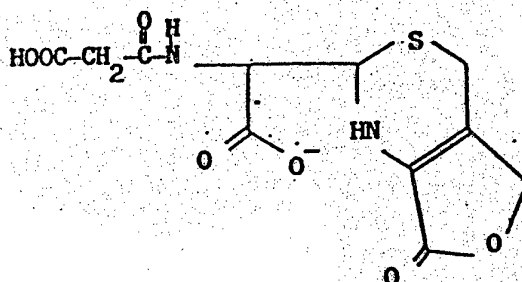
IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Mikroorganizmai, atrinkti selekcijos būdu taip, kad jie, panaudodami laktoną arba jo tirpias druskas, kurių formulė



I

kaip vieningą anglies, azoto ir energijos šaltinį, gali pervesti jį į laktoną arba jo tirpias druskas, turinčius formulę

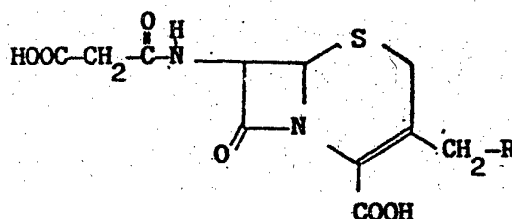


II

ir pastarąjį nekatabolizuoti.

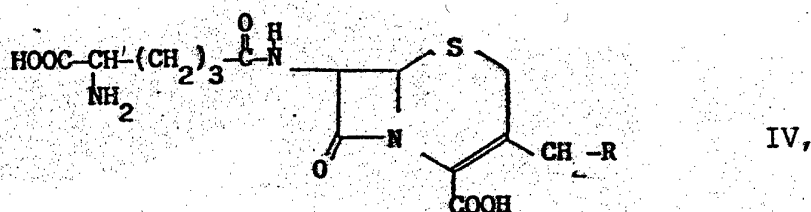
2. Mikroorganizmai pagal 1 punktą, žymimi Sphingomonas sp. FB1 (DSM 7007) bei jų palikuonys ir mutantai.

3. Mikrobiologinis malonil-7-aminocefalosporano rūgšties darinių arba jų tirpių druskų, turinčių formulę



III

gamybos būdas, kai R yra vandenilis, hidroksilas arba acetoksigrupė, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad cefalosporino C darinius arba jų tirpias druskas, kurių bendra formulė



10

o R reikšmės apibrėžtos aukščiau, vartoja kaip substratą ir, veikiant mikroorganizmais pagal 1 punktą, paverčia produktu, kurio formulė III.

15 4. Būdas pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad procesą vykdo naudojant mikroorganizmus Sphingomonas sp. FBI (DSM 7007) bei jų palikuonis ir mutantus.

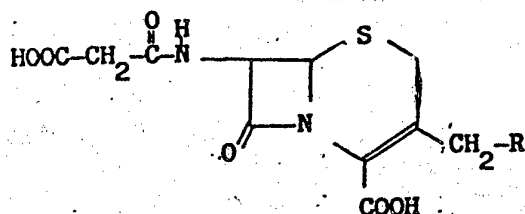
20 5. Būdas pagal bent vieną iš 3 arba 4 punkto, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad kaip substratą naudoja cefalosporiną C.

25 6. Būdas pagal bent vieną iš 3-5 punkto, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad proceso eigoje substratą prideda vienu kartu arba nuolatos taip, kad substrato koncentracija kultūrinėje terpėje neviršytų 20 svorio %.

30 7. Būdas pagal bent vieną iš 3-6 punktų, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad procesą vykdo esant temperatūrai nuo 0 iki 60°C ir pH reikšmėms nuo 5 iki 9.

8. Malonil-7-aminocefalosporano rūgšties dariniai arba jų tirpios druskos, turinčios formulę

35

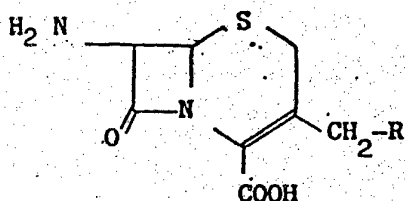


III,

kurioje R yra vandenilis, hidroksilas arba acetoksigrupė.

9. Malonil-7-aminocefalosporano rūgštis.

10. Mikrobiologinis 7-aminocefalosporano rūgšties darinių arba jų tirpių druskų, bendros formulės



V,

kurios R reikšmės apibrėžtos 3 punkte gamybos būdas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad malonil-7-aminocefalosporano rūgšties darinius arba jų tirpias druskas, turinčias formulę III, vartoja kaip substratą, ir Pseudomonas sp. (DSM 7509) genties mikroorganizmų arba jų palikuonių arba mutantų pagalba, arba veikiant fermentais be ląstelių, išskirtais iš šių mikroorganizmų, paverčia produktais, turinčiais formulę V.

11. Būdas pagal 10 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad kaip substratą naudoja malonil-7-aminocefalosporano rūgštį.

12. Būdas pagal bent vieną iš 10 arba 11 punkto, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad proceso eigoje

substratą prideda vienu kartu arba nuolatos taip, kad substrato koncentracija kultūrinėje terpėje neviršytų 10 svorio %.

5. 13. Būdas pagal bent vieną iš 10-12 punktų, b e s i s -
k i r i a n t i s tuo, kad procesą vykdo esant tem-
peratūrai nuo 4 iki 50°C ir pH reikšmėms nuo 4 iki 9.