

Fermentační příprava kyseliny klavulánové

579 663

Ing. MIROSLAVA ÚLEHLOVÁ, Ing. HANA RYŠANOVÁ, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

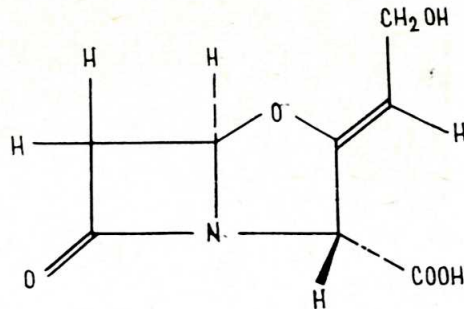
Klíčová slova: kyselina klavulánová, fermentační příprava, difuzní plotnová metoda, inhibitor β -laktamas

ÚVOD

Kyselina klavulánová byla poprvé zjištěna v roce 1976 jako produkt *Streptomyces clavuligerus* [1]. Pracovníci Beecham Laboratories Group Ltd. ve Velké Británii objevili tuto látku v rámci screeningového programu zaměřeného na vyhledávání nových inhibitorů β -laktamas. Program byl motivován snahou použít tyto inhibitory v kombinaci s peniciliny anebo cefalosporiny, a tak se vyrovnat s problémem rostoucí rezistence řady mikrobiálních patogenů schopných produkovat β -laktamasy.

Kyselina klavulánová je účinným inhibitorem β -laktamas a má současně antibakteriální aktivitu proti určitému spektru bakterií [2]. Strukturální vzorec kyseliny klavulánové ukazuje obrázek 1. Představuje bicycklý β -laktam lišící se od penicilinů a cefalosporinů náhradou atomu síry kyslíkem [3].

Vedle uvedeného producenta *Streptomyces clavuligerus* byly později izolovány z přírodních materiálů i další mikroorganismy [4] schopné produkovat kyselinu klavulánovou, např. *Streptomyces jumonjinensis*, *Streptomyces katsurahamanus* a *Streptomyces species P6621*. Tyto di-



Obr. 1. Strukturální vzorec kyseliny klavulánové

voké kmeny izolované většinou z půdy produkovaly kyselinu klavulánovou na velmi nízkých hladinách. Výrobci řeší problematiku genetického vybavení produkčních kmenů a optimalizaci fermentačního procesu. Byla publi-

kována práce [5] o klónování chromozomálních DNA fragmentů *S. clavuligerus* do neprodukcující mutanty a podařilo se vnést DNA segmenty obnovující schopnost mutanty produkovat kyselinu klavulanovou. Bylo zjištěno [4], že ve dvoustupeňové poloprovozní fermentaci s kmenem *S. clavuligerus* je dosažováno v 90. hodině kultivace hladiny 500 μg kyseliny klavulanové na ml půdy. Jako nejdůležitější nutriční zdroj pro fermentaci je uváděn sójový protein; půda dále obsahuje glycerol nebo tukové látky, anorganické soli a odpěňovadlo.

V naší práci jsme se zaměřili na ověření základních podmínek fermentace v baňkách a na stanovení kyseliny klavulanové v půdě. Jako produkční kmeny byly použity: *Streptomyces species ATCC 31450* a *S. jumonjinensis NRRL 5741*.

MATERIÁL A METODY

Produkční kmeny po vyočkování z lyofilizovaných koncentrav nejlépe rostly a sporulovaly na šikmém sporulačním agaru o tomto složení: sacharosa 0,3 %, dextrin 1,5 %, NaCl 0,05 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,05 %, pepton 0,5 %, močovina 0,01 %, kvasničný extrakt 0,1 %, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 1,8 $\cdot 10^{-4}$ %, agar 3,5 %, pH = 7,0, sterilace: 0,12 MPa po 30 min. Kultury zaočkované na šikmých agarech byly kultivovány 10 až 14 dní při 28 °C a uchovávány při 5 °C.

Fermentace v baňkách proběhla ve dvou stupních. Ze šikmých agarů byly zaočkovány 500 ml Erlenmeyerovy baňky plněné 100 ml inokulační půdy. Z inokulačních půd se jako optimální ukázala půda o tomto složení: sladový extrakt 1 %, bakteriologický pepton 1 %, glycerol 2 %, odpěňovadlo 0,01 %, pH půdy před sterilací 7,0, sterilace: 0,12 MPa/30 min. Příprava inokula probíhala na rotační třepačce (frekvence otáčení 230 min^{-1} , excentr 25 mm) po dobu 72 hodin při 28 °C.

Fermentační půdy plněné po 100 ml do 500 ml Erlenmeyerových baňek byly zaočkovány 5 % připraveného inokula. Fermentace probíhala na třepačce za stejných podmínek po dobu 96 hodin. Z testovaných produkčních půd se pro *Streptomyces sp. ATCC 31450* nejlépe osvědčila půda o tomto složení: dextrin 2 %, sójová mouka 1 %, kvasničný extrakt 0,1 %, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,01 %, odpěňovadlo 0,01 %; pH bylo před sterilací upraveno na 7,0. Pro *Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741* nejlépe vyhovovala fermentační půda: sójová mouka 3 %, rozpustný škrob 4,7 %, $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,01 %, K_2HPO_4 0,01 %, odpěňovadlo 0,01 %; pH půdy bylo rovněž upraveno na 7,0. Po ukončení fermentace byl z média odštěpením odstraněny nerozpustné zbytky půdy a biomasa.

Mikrobiologické stanovení kyseliny klavulanové

Pro stanovení kyseliny klavulanové byla použita plotnová difúzní metoda využívající testovacího mikroorganismu *Klebsiella pneumoniae ATCC 29665* s konstitutivní produkcí β -laktamas.

Jako půdy pro stanovení bylo použito živného agaru (hovězí extrakt 0,1 % /firma Difco, Michigan USA/, kvasničný extrakt 0,2 % /firma Difco Michigan, USA/, pepton 0,5 %, NaCl 0,5 %, agar 2 %, pH před sterilací 7,4). Do 300 ml agaru vytemperovaného na 55 °C byl přidáván sterilní roztok penicilínu G v optimální koncentraci 100 j. penicilínu G/ml živného agaru. Po vytemperování na 48 °C byla do půdy přidána hustá suspenze buněk *K. pneumoniae* připravená smytím několika šikmých agarů s čerstvě nakultivovanou *K. pneumoniae*. Po důkladném promíchání byla půda nalita na připravenou plotnu o rozměrech 34 cm \times 34 cm, umožňující stanovení 100 vzorků. Na takto připravenou půdu s penicilínem a testovacím mikroorganismem byly do nastavených válečků (nerezavějící ocel) o vnitřním \varnothing 6 mm pipetovány vzorky fermentovaných půd a standardy v různých ředěních. Jako standardu bylo použito draselné soli kyseliny klavulanové s účinností 82,5 % volné kyseliny (výrobce Beecham Pharmaceuticals Group Ltd. Velká Británie). Plotny byly inkubovány 18 hodin při 37 °C v termostatu.

VÝSLEDKY

Na základě průměrů inhibičních zón na plotnách a údajů zjištěných pro standardy, byly vyhodnoceny koncentrace inhibitoru β -laktamas ve fermentačních půdách. Inhibiční zóny na paralelních kontrolních plotnách bez penicilínu byly nulové nebo stopové, což odpovídá velmi slabé antibakteriální aktivitě kyseliny klavulanové; tím bylo potvrzeno, že stanovená aktivita náleží inhibitoru β -laktamas. Inhibiční aktivita samotné nezaočkované fermentační půdy byla nulová.

Byla ověřena možnost laboratorní fermentační přípravy inhibitoru β -laktamas kyseliny klavulanové a vypracován způsob jejího stanovení plotnovou difúzní metodou. U kmene *Streptomyces species ATCC 31450* bylo dosaženo produkce 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ média a u kmene *Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741* byla nejvyšší produkce 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Literatura

- [1] BROWN A. G., et al.: J. Antibiot., **29**, 1976, s. 668
- [2] READING C., COLE M.: Antimicrob. Agents Chemother., **11**, 1977, s. 852
- [3] HOWARTH T. T., BROWN A. G., KING T. J.: J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1976, s. 226
- [4] BUTTERWORTH D.: Biotechnology of Industrial Antibiotics (E. J. Vandamme, ed.), Marcel Dekker Publ., New York, 1984, s. 225
- [5] BAILEY C. R., et al.: Bio/Technology, **2**, 1984, s. 808

Lektoroval dr. Jiří Plachý

Úlehlová, M. - Ryšánová, H.: Fermentační příprava kyseliny klavulanové. Kvas. prům., **35**, 1989, č. 6, s. 169—170.

Kmeny *Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741* a *Streptomyces species ATCC 31450* byly použity pro laboratorní fermentační přípravu inhibitoru β -laktamas kyseliny klavulanové. Mikrobiologickou difúzní metodou byla stanovena koncentrace kyseliny klavulanové v půdě dosahující maximální hladiny 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Угелова, М. - Рышанова, Г.: Ферментационная подготовка клавулановой кислоты. Квас. прум., **35**, 1989, № 6, стр. 169—170.

Ферментационная подготовка клавулановой кислоты — ингибитора β -лактамаз — основана на культивации штаммов: *Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741* и *Streptomyces species ATCC 31450*.

Микробиологическим методом определения концентрации клавулановой кислоты была обнаружена максимальная продукция до 20 микрограммов/мл ферментационной среды.

Úlehlová, M. - Ryšánová, H.: Fermentation of Clavulanic Acid. Kvas. prům., **35**, 1989, No. 6, pp. 169—170.

Strains *Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741* and *Streptomyces species ATCC 31450* were used for the laboratory flask preparation of the β -lactamase inhibitor clavulanic acid. Concentration of the clavulanic acid in fermentation broths was estimated by a microbiological diffusion method in the maximum level 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Úlehlová, M. - Ryšánová, H.: Fermentative Produktion der Klavulan-Säure. Kvas. prům., **35**, 1989, Nr. 6, S. 169—170.

Die Stämme *Streptomyces jumonjinensis NRRL 5741* und *Streptomyces species ATCC 31450* waren für Laborfermentationsverfahren der β -Laktamase von Klavulan-säurevorbereitung ausgenutzt. Die Konzentration der Klavulansäure wurde mit mikrobiologischen Diffusionsmethode abgestimmt. Das Niveau der maximalen Werte reicht 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$.