

Культуральные жидкости, содержащие антибиотики в общем случае вырабатываются после достижения максимального содержания. В большинстве случаев первым шагом является разделение клеток и твердых частиц при помощи фильтрации или центрифугирования. За этим может следовать концентрирование ценных составляющих путем экстракции или адсорбции. Как правило, затем очищенный продукт кристаллизуется и может обрабатываться для получения полусинтетических антибиотиков.

Недостатком этого пошагового метода является нестабильность большого количества молекул антибиотиков, например таких как цефалоспорин С (ЦФС). ЦФС разлагается уже во время ферментации. Это происходит либо чисто химически - вода воздействует на β -лактамное кольцо, либо ферментативно - например при помощи эстераз (Konesny et al., 1973 // J. of Antib. 26, 3, 135 - 141). Во время ферментации также образуется ряд вторичных продуктов, таких как деацетоксицефалоспорин С (ДОЦФС) и деацетилцефалоспорин С (ДЦФС), которые нужно удалять из ЦФС на этапе очистки. Это приводит к значительному уменьшению выхода.

Системы проточной фильтрации с использованием полимерных или керамических мембран уже использовались для обработки культуральных жидкостей, содержащих антибиотики (Harris et al. // J. Chem. Technol. Biotechnol. 1988, 42, 19 - 30). Однако до сих пор не было обнаружено пониженное разложение цефалоспоринов С в этих процессах.

Предметом настоящего изобретения является обнаружение способа, при котором можно уменьшить разложение цефалоспоринов С и образование вторичных продуктов, а также увеличить выход по отношению к используемому субстрату.

Неожиданно было обнаружено, что применение узла проточной фильтрации при ферментации *Acremonium chrysogenum* позволяет увеличить выход ЦФС, уменьшить образование ДЦФС и увеличить время производства. Такая фильтрация и тот факт, что образуются малые количества ДЦФС, дополнительно существенно упрощают получение цефалоспоринов С.

Таким образом, настоящее изобретение относится к методу получения ЦФС, который заключается в фильтровании раствора ферментации через систему проточной фильтрации и возможности замены удаляемого количества фильтрата в ферментере.

В методе согласно настоящего изобретения для использования подходят *Acremonium chrysogenum* (*Cephalosporium acremonium*), а также их мутанты и продукты селекции, поскольку они производят ЦФС-производные.

Питательный раствор содержит источники углерода, такие как сахароза, кукурузный крахмал, декстроза или меласса, а также источники азота, такие как соевая мука, мука арахиса, экстракт солода или ацетат аммония.

Питательный раствор также содержит такие неорганические соли, как гидрофосфат натрия, хлорид натрия, хлорид кальция, сульфат кальция, карбонат кальция, сульфат магния или дигидрофосфат калия. В питательную среду можно также добавить такие жиры, как метилолеат или соевое масло. Также добавляются микроэлементы, такие соли железа, меди, цинка, кобальта или других металлов.

Acremonium chrysogenum (*Cephalosporium acremonium*), предпочтительно DSM 6473 культивируется при 20 - 30°C, предпочтительно при 25°C, и при pH от 5 до 8, предпочтительно pH 7. Сначала оно культивируется аэробно в вибраторной колбе, а затем в ферментере с перемешиванием и аэрированием воздухом или чистым кислородом. Эти микроорганизмы культивируются в ферментерах в течение 120 - 240 часов, предпочтительно 130 - 170 ч.

Используемые системы проточной, фильтрации могут быть плоскими модулями, трубчатыми модулями, капиллярными модулями, спиральными модулями или мембранными модулями с пустотелыми волокнами, изготовленными из полимеров, графита или керамики с возможностью разделения от сверхтонкой фильтрации до стерильной фильтрации. Предпочтительно использовать фильтрационные модули, имеющие размер пор от 0,2 мкм либо 4 нм. Мембрана может быть изготовлена из полисульфонов, полиамидов, ацетата целлюлозы, оксида алюминия или оксида циркония. Фильтрацию можно осуществлять непрерывно или по порциям. Ее начинают примерно через 2 - 3 дня после инокуляции ферментера, и продолжают до конца ферментации. Скорость потока раствора ферментации через поверхность фильтрации составляет 1 - 20 м/с, предпочтительно 1 - 10 м/с.

Фильтрат, вытягиваемый из ферментера во время ферментации, можно заменить соответствующим количеством жидкости, либо, по другой методике, этот фильтрат может снова поступать в ферментер после отделения ценного продукта, например с помощью абсорбции. С этой целью внутрь может подаваться вода, обогащенная соответствующими солями или другими компонентами питательной среды.

Жидкость, не прошедшая мембрану, повторно подавалась в ферментер. Ферментер и система проточной фильтрации связаны соответствующими трубками и простерилизованы перед ферментацией. На 100 л объема ферментера требуется приблизительно 0,2 м² фильтрационной поверхности. Можно также использовать меньшие или большие фильтрационные поверхности.

Пример 1. Ферментация *Acremonium chrysogenum* DSM 6473.

Ферментация проводилась в таком питательном растворе:

Предкультивационная среда, г/л:

Кукурузная замочка	11,75
Ацетат аммония	4,5
Сахароза	20,0
CaSO ₄ · 2H ₂ O	0,5
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
pH 7,0 (доведено при помощи % NaOH) 15 вес.	
Среда ферментации, г/л:	
Обезжиренная мука арахиса	100,0
Ацетат аммония	6,0

Моногидрат глюкозы	5,0
Метилолеат	5,0
D,L-Метионин	3,0
CaSO ₄ · 2H ₂ O	5,0
MnSO ₄ · 7H ₂ O	5,0
CaCO ₃	5,0
Противовспениватель	0,5

Раствор дозагрузки:

Моногидрат глюкозы	500,0
D,L-Метионин	24,5

Для инокуляции предкультивационной среды (500 мл вибрационная колба с 4 перегородками) были использованы косячки агара. В этих колбах культивация протекала на протяжении 48ч при 150 оборотах в минуту при 25 - 28°C. Эти культуры были использованы для инокуляции еще одной предкультуры (1000мл среды, 5000мл колбы, 25 - 28°C, 120об/мин, от 58 до 60ч). Вторая предкультура используется для инокуляции 60л среды ферментации в ферментере с мешалкой. Ферментация проводится при 25°C. Поток газа контролировался таким образом, чтобы pO₂ в питательном растворе ферментации превышало 20%.

После 74ч ферментации была начата фильтрация с использованием проточного керамического модуля (изготовленного фирмой "Мембрафлор", α-Al₂O₃), поверхность фильтрации которого была равной 0,2м², а размер пор - 0,2мкм. Придерживались следующих параметров процесса:

Скорость потока, м/с	2
Скорость прокачки, л/ч	1500
Производительность фильтрации, л/ч	2
Время фильтрации, ч	68

В табл.1 приведены результаты после 142ч ферментации без (А) и с (В) проточной фильтрации:

Пример 2. Ферментация проводилась так, как описано в примере 1. В табл.2 приведены результаты после 167ч ферментации с проточной фильтрацией (В) по сравнению с параллельной ферментацией без фильтрации, которая была прекращена после 142ч.

Т а б л и ц а 1

	ЦФС, %	ДЦФС/ЦФС, %	Производительность ЦФС		Производи- тельность ДЦФС после 6 дней, %
			макс. %	после 6 дней, %	
А	100	100	100	100	100
В	140	44	200	400	53

Т а б л и ц а 2

	ЦФС, %	ДЦФС/ЦФС, %
А (142 ч)	100	100
В (167 ч)	129	69