



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

213 099

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 26 09 80
(21) PV 6513-80

(51) Int. Cl.³ C12 P 37/00

(40) Zveřejněno 31 08 81
(45) Vydáno 01 01 84

(75)

Autor vynálezu

GUTTMANN TOMÁŠ dr.

ZEMAN ROMAN dr.

VOJTÍŠEK VLADIMÍR dr.CSc.

ČULÍK KAREL dr.

BÁRTA MIROSLAV dr.

DENK RAIMUND ing., PRAHA

(54)

Způsob kontinuální výroby kyseliny 6-aminopenicilánové

Vynález se týká kontinuální výroby kyseliny 6-aminopenicilánové enzymovou hydrolýzou draselné soli benzylpenicilinu, pomocí katalyzátoru na bázi vzájemně chemicky vázaných buněk producenta penicilínacylázy, v systému nejméně dvou průtokových reaktorů, kde je katalyzátor udržován ve vzhledu, hodnota pH na 7,6, teplota na 37 °C a koncentrace substrátu v rozmezí kolem 0,2 mol/litr.

Vynález se týká způsobu kontinuální výroby kyseliny 6-aminopenicilanové enzymovou hydrolýzou penicilinu, zejména benzylpenicilinu.

Je znám způsob výroby 6-aminopenicilanové kyseliny (dále jen 6-APK) hydrolýzou penicilinu vázanými buňkami s penicilinacylázovou aktivitou (čs. autorské osvědčení č. 209676), jejichž příprava je rovněž známa (čs. autorské osvědčení č. 203607). Jde o enzymovou hydrolýzu prováděnou buď vsádkovým způsobem, recirkulací vrstvou vázaných buněk, nebo proudem roztoku penicilinu dvěma nebo více sloupci vázaných buněk. Posledně jmenovaná alternativa umožňuje kontinualizaci provozu. Nevýhodou způsobu hydrolýzy penicilinu na sloupci s pevným ložem je pokles hodnoty pH konverzní směsi uvnitř sloupce, který lze sice omezit, například použitím pufru, ale jen omezeně. To vede k nižší stabilitě vázaných buněk ve srovnání se vsádkovým způsobem. Kromě toho jsou vázané buňky méně využity, štěpí-li penicilin při nižším pH. Tyto nevýhody lze zmenšit zvyšováním počtu sloupců v sérii, mezi nimiž je upravováno pH protékající konverzní směsí. Při vsádkovém způsobu je poločas aktivity vázaných buněk 9 týdnů nepřetržitého provozu (asi 1 100 opakovaných konverzí) a využití materiálu je asi 6 litrů 6,5 %ního roztoku penicilinu rozštěpeného 1 kg katalyzátoru za 1 hod. K dosažení takové stability a takového využití vázaných buněk na sloupci s pevným ložem je třeba použít okolo 10 sloupců v sérii, což je technicky značně náročné. Například při použití 4 sloupců s pevným ložem katalyzátoru zapojeným v sérii je operační poločas aktivity vázaných buněk maximálně 450 hod.

Při kontinuálním způsobu výroby podle citovaného čs. autorského osvědčení č. 209676 vznikají další komplikace zhoršování průtoku sloupců následkem stlačení částic katalyzátoru při delším provozu, což vede k velkým tlakovým ztrátám a ke zvýšení nároků na celé zařízení (tlakové kolony a spoje). Kromě toho vzniká při hydrolýze penicilinu tímto způsobem více degradačních produktů penicilinu i 6-APK.

Bylo zjištěno, že uvedené nevýhody popsaného uspořádání lze odstranit jednoduchým technickým řešením, a to způsobem kontinuální výroby kyseliny 6-aminopenicilanové enzymovou hydrolýzou penicilinu, zejména benzylpenicilinu, podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se vodný roztok penicilinu, zejména roztok draselné soli benzylpenicilinu, o koncentraci 0,03 až 0,3 mol/litr, s výhodou 0,18 mol/litr, protékající alespoň dvěma průtokovými reaktory, zapojenými v sérii, uvádí ve vztahu ve styk s katalyzátorem na bázi vzájemně chemicky vázaných buněk producenta penicilinacylázy, za stálého udržování pH na hodnotě 7,0 až 8,0, s výhodou 7,6 a za teploty 20 až 50 °C, s výhodou 37 °C, v každém reaktoru, načež se z reakční směsi, opouštějící poslední reaktor, izoluje kyselina 6-aminopenicilanová, popřípadě regeneruje kyselina fenylactová.

Při provedení způsobu podle vynálezu je možno používat například zařízení, které sestává z chlazených zásobníků pro výchozí substrát a produkt enzymové konverze, vyhřívaných nádob opatřených míchadly, sloužících jako reaktory, čerpadel, spojovacích trubíc a zařízení pro úpravu pH. Vodný roztok draselné soli benzylpenicilinu, respektive konverzní směs, se postupně čerpá systémem čerpadel do jednotlivých reaktorů, kde je míchána suspenze katalyzátoru na bázi vzájemně chemicky vázaných buněk. Ve všech reaktorech se udržuje optimální hodnota pH kontantním přidáváním vodného roztoku alkálie buď pomocí pH-statů nebo kontinuálně. Přítoková rychlost roztoku alkálie se volí tak, aby se konverzní směs podstatně nezře-

dovaly. Všechny průtokové rychlosti jsou řízeny tak, aby se neměnily pracovní objemy reaktorů. Zadržování částic katalyzátoru v reaktorech lze dosáhnout tím, že trubice odsávající konverzní směs z reaktoru je opatřena filtrační plachetkou, která je umístěna těsně nad míchadlem, nebo je konverzní směs odsávána z reaktoru pomocí odkalovací trubice. Částice katalyzátoru jsou společně s konverzní směsí nasávány do odkalovací trubice, kde již mohou volně sedimentovat, protože nejsou míchány. Je-li sedimentační rychlost částic katalyzátoru větší než postupná rychlost čerpané kapaliny vzhůru odkalovací trubicí, potom setrvávají částice v reaktoru. Pro případ jejich úniku může být výtok z posledního reaktoru opatřen filtrem, z něhož mohou být zachycené částice vráceny do reaktorů. Z konverzní směsi vytékající z posledního reaktoru se buď kontinuálně, nebo v určitých časových intervalech izoluje 6-APK a popřípadě regeneruje fenyl-octová kyselina tak, že se směs ihned ochladí a míchá s ochlazeným octanem butylnatým ve vhodném objemovém poměru, nejlépe 1 : 3, za současné úpravy pH zředěnou kyselinou sírovou na 4,3, což je hodnota izoelektrického bodu 6-APK. Po dokončené krystalizaci se 6-APK odfiltruje, promyje ledovou vodou a vychlazeným acetonem a usuší, přičemž z butylacetátového extraktu lze regenerovat kyselinu fenyl-octovou za současné regenerace rozpouštědla.

Předností způsobu výroby podle vynálezu je jeho kontinualizace při vysoké stabilitě katalyzátoru, s operačním poločasem aktivity 1 500 hod. nepřetržitého provozu. Využití katalyzátoru při průtokovém uspořádání konverze roste s počtem v sérii zapojených reaktorů. Maximálního využití určitého množství katalyzátoru, rozděleného do více reaktorů, se dosáhne tehdy, jsou-li jeho hmotnosti ve všech reaktorech stejné. Míru využití vázaných buněk při použití průtokových míchaných reaktorů v sérii lze odvodit z kinetické rovnice pro průtokový reaktor a ze změřeného průběhu konverze v závislosti na čase při vsádkové konverzi. Při vsádkovém (diskontinuálním) způsobu kompletně rozštěpí 1 kg vázaných buněk o aktivitě 6 $\mu\text{mol/mg/h}$ asi 6 litrů 6,5%ního roztoku penicilinu. Při použití průtokových reaktorů rozštěpí 1 kg vázaných buněk, rozdělený rovnoměrně do 6 reaktorů 0,3, 2,0, 3,0, 3,3, 3,8 a 4,4 litru 6,5%ního roztoku penicilinu za 1 hodinu.

Způsob podle vynálezu má ve srovnání se způsobem podle čs.autorského osvědčení č. 209676 tyto výhody:

- penicilin lze hydrolyzovat na 6-APK kontinuálně, přičemž stabilita enzymové aktivity vázaných buněk je stejná jako při vsádkovém (diskontinuálním) způsobu. Při použití většího počtu reaktorů zapojených v sérii lze dosáhnout přibližně stejného využití katalyzátoru jako u diskontinuálního způsobu;
- množství degradačních produktů je nižší než při průtokovém způsobu konverze na sloupcích s pevným ložem;
- operační stabilita vázaných buněk je vyšší než při použití sloupců s pevným ložem, realizace výroby je technicky méně náročná a navíc odpadají náklady spojené s používáním pufrů potřebných při konverzi na sloupcích, takže se zjednodušuje i izolace 6-APK;
- způsob podle vynálezu a jeho provedení má ve srovnání se způsoby používajícími různé imobilizované materiály pro enzymovou hydrolyzu penicilinu na 6-APK výhodu především v zajištění vysoké stability katalyzátoru a z toho vyplývající možnosti dlouhodobého

kontinuálního provozu, což zvyšuje ekonomickou efektivnost výroby.

Pro kontinuální výrobu G-APK podle vynálezu byly použity chemicky navzájem vázané buňky s penicilinacylázovou aktivitou, získané podle čs. autorského osvědčení č. 203607. a č. 209265.

Bližší podrobnosti způsobu podle vynálezu vyplývají z příkladů provedení, které tento způsob pouze ilustrují, ale nijak neomezuji na látky, zařízení, postup nebo podmínky v nich uvedené.

Příklad 1

Dvě 150 ml kádinky byly umístěny ve vodní lázni vyhřívané na 37 °C. V každé kádince bylo 20 g biokatalyzátoru na bázi navzájem chemicky vázaných buněk, s těmito charakteristikami: sedimentační rychlost ve vodě 0,4 cm/sek, velikost částic 0,2 až 0,8 mm (průměr 0,5 mm), sušina 35 % hmot., specifická aktivita 5,5 μmol /6-APK/h/mg vlhké hmoty (42 °C, pH 7,6). Suspenze, jejichž objem v každé kádince byl 75 ml, byly míchány intenzitou 200 ot/min. Před spuštěním průtokového provozu byla směs biokatalyzátoru a 6,5%ního roztoku draselné soli benzylpenicilinu ponechána reagovat vsádkově 30 minut v první kádince a 60 minut ve druhé, za úpravy pH čpavkovou vodou na hodnotu 7,6, dokud koncentrace penicilinu v kádinkách neklesla asi na 12 % hmot., respektive 0 % hmot. výchozího množství, což odpovídá stacionárnímu stavu při průtokovém provozu. Teprve po dosažení tohoto stavu byl spuštěn průtokový provoz. Ze zásobníku byl čerpán 6,5%ní roztok draselné soli benzylpenicilinu do první kádinky rychlostí 50 ml/h, a částečně zkonvertovaný roztok do druhé kádinky rychlostí 51 ml/h a zcela zkonvertovaný roztok z druhé kádinky ven rychlostí 52 ml/h. V obou kádinkách bylo pH udržováno na hodnotě 7,6 přídavkem 15,5%ní čpavkové vody do první kádinky a 1,8%ního roztoku do druhé kádinky rychlostí 1 ml/h. Systém byl v provozu nepřetržitě 240 hodin. Po celou tuto dobu bylo v první kádince přítomno 12 % zbytkového penicilinu a ve druhé kádince nic. Průměrné množství degradačních produktů vznikajících při konverzi bylo 3,5 % hmot., průměrná účinnost konverze tedy činila 96,5 % teorie.

Příklad 2

Do dvou 20litrových fermentačních tanků bylo umístěno 7,5 litrů suspenze obsahující 2 kg biokatalyzátoru jako v příkladu 1. Suspenze byly zahřívány na 37 °C a míchány 180 ot/min. Provoz byl zahájen jako v příkladu 1. Třemi čerpadly byl čerpán vodný roztok draselné soli benzylpenicilinu ze zásobníku do prvního reaktoru rychlostí 5,0 litrů/h, z prvního do druhého reaktoru rychlostí 5,1 litrů/h a z druhého reaktoru do zásobníku konverzní směsi rychlostí 5,2 litrů/h. Zásobníky roztoku draselné soli benzylpenicilinu i konverzní směsi byly chlazeny na teplotu 5 °C. V obou tancích bylo pH udržováno na hodnotě 7,6 přídavkem čpavkové vody o hmotnostní koncentraci 1,8 % do druhého tanku rychlostí 100 ml/h. Na výtok z druhého tanku byly vyplavené částice katalyzátoru zachycovány na filtru a uniklý materiál, asi 40 g denně, byl vrácen do tanků, které byly v provozu 120 h. Po celou dobu provozu bylo v prvním tanku přítomno 12 % zbytkového penicilinu a v druhém tanku nic. Z konverzní směsi v zásobníku byla vždy po 12 h izolována 6-APK popsáním postupem. Výtěžek 6-APK činil průměrně 80 % teorie, bez zpracování matečných louhů. Fenylactová kyselina byla regenerována obvyklým způsobem.

Příklad 3

Tři 50 ml baňky, sloužící jako reaktory, opatřené uzávěrem s otvory pro přívod roztoku draselné soli benzylpenicilinu a čpavkové vody a pro odtok konverzní směsi, byly umístěny v sušárně při 37 °C. V každé baňce bylo 25 ml suspenze obsahující 6 g biokatalyzátoru jako v příkladu 1. Před zahájením provozu se nechala směs biokatalyzátoru a 6,5%ního roztoku draselné soli benzylpenicilinu reagovat vsádkově za úpravy pH na hodnotu 7,6 v prvním reaktoru 17 minut, 33 v druhém a 60 v třetím, aby v jednotlivých reaktorech bylo dosaženo 26,10 a 0 % zbytkového penicilinu, což odpovídá stacionárnímu stavu za podmínek průtokového provozu. Teprve potom byly reaktory těsně uzavřeny a byl spuštěn průtokový provoz. Do prvního reaktoru byl čerpán roztok draselné soli benzylpenicilinu rychlostí 50 ml/h, z posledního reaktoru vytékala konverzní směs, v důsledku přítoku čpavkové vody do reaktorů, rychlostí 53 ml/h. Konverzní směsi byly odsávány z reaktorů stejně jako v příkladu 1. Do reaktoru přitékal roztok čpavkové vody rychlostí 1 ml/h, ve hmotnostní koncentraci 12,8 % do prvního reaktoru, 2,8 % do druhého a 1,8 % do třetího reaktoru. Reaktory byly v provozu 48 hodin. Po celou dobu provozu bylo množství zbytkového penicilinu v prvním, druhém, respektive třetím reaktoru 26, 10, respektive 0 %, což znamená, že bylo dosaženo 74, 90 a 100%ní konverze penicilinu na 6-APK.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob kontinuální výroby kyseliny 6-aminopenicilanové enzymovou hydrolyzou penicilinu, zejména benzylpenicilinu, vyznačující se tím, že se vodný roztok penicilinu, zejména roztok draselné soli benzylpenicilinu, o koncentraci 0,03 až 0,3 mol/litr, s výhodou 0,18 mol/litr, protékající alespoň dvěma průtokovými reaktory, zapojenými v sérii, uvádí ve vzhledu ve styk s katalyzátorem na bázi vzájemně chemicky vázaných buněk producenta penicilinacylázy, za stálého udržování pH na hodnotě 7,0 až 8,0, s výhodou 7,6 a za teploty 20 až 50 °C, s výhodou 37 °C, v každém reaktoru, načež se z reakční směsi, opouštějící poslední reaktor, izoluje kyselina 6-aminopenicilanová, popřípadě regeneruje kyselina fenylactová.