



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

213 127

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 15 10 80
(21) PV 6980-80

(51) Int. Cl.³ C 12 P 13/20

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

(75)
Autor vynálezu VOJTÍŠEK VLADIMÍR Dr.CSc., BÁRTA MIROSLAV Dr., NETRVAL JIŘÍ Dr., ČULÍK KAREL Dr.,
PÍRKO JAROMÍR Ing., PRAHA, ŠVEC FRANTIŠEK Ing., HŘEBEČ a CHROMÍK JINDŘICH Ing.
CSc., PRAHA

(54) Způsob enzymové výroby kyseliny L-asparagové

Vynález se týká způsobu enzymové výroby kyseliny L-asparagové z fumaranu amonného diskontinuálním, semikontinuálním nebo kontinuálním způsobem pomocí speciálně vyvinutých buněčných katalyzátorů na bázi zesíťené, permeabilizované, popřípadě aktivované biomasy, nebo na bázi navzájem chemicky vázaných mikrobiálních producentů enzymu aspartázy.

Vynález se týká způsobu enzymové výroby kyseliny L-asparagové, důležité aminokyseliny používané ve stále rostoucí míře ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu; v této souvislosti stoupá proto i zájem o její ekonomickou velkovýrobu.

Kyselinu asparagovou lze principiálně vyrábět chemickou nebo biologickou cestou. Vzhledem ke skutečnosti, že pro žádané účely je použitelný pouze L-stereoisomer kyseliny asparagové, nabývá průmyslového významu především způsob biologický, který umožňuje selektivní produkci požadovaného isomeru, čímž odpadá složité a nákladné dělení D,L-formy, vznikající chemickou syntézou.

Biologických cest k přípravě kyseliny L-asparagové je několik:

a/fermentace vhodných mikroorganismů, vylučujících kyselinu do kultivačního media, ze kterého se pak izoluje,

b/jednorázovou submerzní kultivací se vypěstují buňky mikroorganismů s aspartázovou aktivitou, které se buď s kultivačním mediem nebo po oddělení od kultivačního media suspendují v roztoku substrátu, fumaranu amonného, který je za míchání při vhodné teplotě po určité době konvertován na kyselinu L-asparagovou. Ta se po oddělení buněk izoluje.

c/použití izolovaného enzymu aspartázy vázaného na vhodný nosič,

d/použití vázaných buněk s aspartázovou aktivitou.

Způsoby zmíněné sub a/ a b/ vyžadují, aby pro každou výrobní šarži byly vypěstovány vždy nové buňky ve velkokapacitních fermentačních tancích, což je záležitost surovinově i energeticky značně náročná, nehledě k tomu, že takto vyrobená kyselina L-asparagová není příliš čistá, poněvadž obsahuje produkty autolýzy nativních buněk produkčních mikroorganismů, vznikajících v průběhu konverze a různé příměsi, pocházející ze zbytků vyfermentované živné půdy.

Ve snaze o ekonomizaci výroby kyseliny L-asparagové byla vypracována řada postupů, při kterých se enzym i buňky s aspartázovou aktivitou svazují buď s vhodným nosičem nebo navzájem, jak je zmíněno sub c/ a d/. Tyto postupy dovoluují vícenásobné kontinuální využití enzymu nebo buněk a izolovaná kyselina L-asparagová je velmi čistá /F.Švec se sp., Chemické listy 74, 82, 1980 /. Je zřejmé, že využití vázaných buněk má oproti vázanému enzymu řadu výhod, zejména ekonomického charakteru, promítajících se v nižších výrobních nákladech na přípravu vázaného biokatalyzátoru a ve vyšší operační stabilitě. Zatím nejúspěšnějších výsledků bylo dosaženo metodou zachycení nativních živých buněk v gelové matici, a to buď přímým zabudováním do polymerů rozpustných ve vodě či v organických rozpouštědlech nebo do sítě vznikajícího polymeru, zejména při radikálové kopolymeraci akrylamidu s methylen-bis-akryl-amidem /USA/ pat.spis.č.3 791 926 ; SU pat.spis.č. 659 611 /, kdy bylo dosaženo až 70 % výtěžku aktivity zmíněným způsobem vázaných mikrobiálních buněk, zejména E.coli. Uvedené způsoby vazby nativních buněk s aspartázovou aktivitou však mají i své nevýhody, zejména skutečnost, že při vícenásobném nebo kontinuálním použití nativní buňky v doméně gelové matrice autolyzují, což se projeví přechodným zvýšením jejich aktivity a posléze postupným poklesem aktivity katalyzátoru následkem vyplavování z gelové matrice, z čehož rezultuje kratší operační poločas materiálu / T.Tosa se sp., Appl.Microbiol. 27, 886, 1974 /.

V citované práci /Chemické listy 74,82,1980/ jsou uvedeny rovněž další způsoby vazby buněk s aspartázovou aktivitou, například použití polyfunkčních síťovacích činidel, zejména 2,4-toluendiisokyanátu a glutardialdehydu, s cílem kovalentního zesítní vnitrobuněčného obsahu jednotlivých mikrobiálních buněk s aspartázovou aktivitou a tím dosažení fixace tohoto enzymu v buňkách s možností jejich opakovaného použití pro přípravu kyseliny L-asparagové. V případě aplikace 2,4-toluendiisokyanátu byla aktivita zesítněných buněk nulová, v případě glutardialdehydu činila aktivita zesítněných buněk v optimálním případě 34 % aktivity výchozí. Z naznačených důvodů nedospěly tyto způsoby vázání buněk do stadia průmyslového využití.

Bylo zjištěno, že za selektivních reakčních podmínek zesítní vnitrobuněčného obsahu buněk produkčního mikroorganismu s aspartázovou aktivitou pomocí dialdehydů, zejména glutardialdehydu, lze získat produkt, který po následné permeabilizaci zesítněných buněk fyzikálními nebo fyzikálně-chemickými vlivy, popřípadě kombinací, vykazuje až 70 % aktivity

213 127

aspartázy v zesíťených a permeabilizovaných buňkách. Selektivní aktivací enzymu aspartázy při dalším ošetření těchto buněk lze dosáhnout až 100 % původní aktivity. Takto upravené buňky představují katalyzátor, který je použitelný pro enzymovou výrobu kyseliny L-asparagové a který je tak stabilní, že dovoluje dlouhodobý diskontinuální, semikontinuální nebo kontinuální provoz při vysoké počáteční koncentraci substrátu, tj. fumaranu amonného, která se pohybuje na hranici jeho rozpustnosti (1,5 mol/litr). Izolovaná kyselina L-asparagová je velmi čistá a použitelná pro obvyklé účely, zejména pro přípravu solí, sloužících jako léčiva. Výtěžek čisté kyseliny se pohybuje okolo 95 % teorie. Účinnost enzymové konverze v rozmezí počátečních koncentrací fumaranu amonného 0,5 až 1,5 mol/litr je 100 %, při zajištění optimálních podmínek, tj. množství katalyzátoru, počáteční koncentrace substrátu a reakční doby.

Na základě uvedených poznatků byl vypracován způsob enzymové výroby kyseliny L-asparagové podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se vodný roztok fumaranu amonného v koncentraci 0,05 až 1,5 mol/litr, s výhodou 1,35 mol/litr, s hodnotou pH 6,5 až 9,5, s výhodou 8,5, s přísadou kationtů hořčíku a popřípadě s přísadou neionogenního tenzidu, uvádí při teplotě 10 až 50 °C, s výhodou 35 až 38 °C, diskontinuálně, semikontinuálně nebo kontinuálně ve styk s katalyzátorem na bázi zesíťené a permeabilizované, popřípadě aktivované biomasy mikrobiálního producenta aspartázy nebo na bázi navzájem chemicky vázaných buněk tohoto producenta, načež se po ukončené konverzi izoluje z odděleného kapalného podílu kyselina L-asparagová.

Mimo výhodnou možnost opakovaného použití katalyzátoru na bázi vázaných buněk s aspartázovou aktivitou pro enzymovou výrobu kyseliny L-asparagové, je předností způsobu podle vynálezu jeho rychlost, neboť není nutno dbát na úplnou separaci buněčné hmoty do formy pasty a katalyzátor není třeba promývat. Zbytkový objem reakční směsi po biotransformaci, který zůstává v zahuštěném sedimentu, se ihned vrací do procesu při zahájení druhého a dalšího cyklu enzymové transformace; jednorázový postup lze tak měnit na semikontinuální postup, kdy po 1 až 2 hodinách je možno cyklus opakovat. Supernatant získaný po oddělení katalyzátoru se ihned zpracovává zahřátím na 90 °C a úpravou pH 60% kyselinou sírovou na hodnotu 2,8; asi po 2 hodinách stání roztoku při teplotě 10 až 15 °C se volně vykrytalovaná kyselina L-asparagová odfiltruje, promyje studenou vodou a usuší, popřípadě zpracuje dále podle potřeby. Z matečných louhů lze výhodně regenerovat síran amonný, který má, jak známo, mnohostranné použití, například jako hnojivo nebo součást hnojiv či jako součást živných půd pro různé fermentační technologie.

Další předností způsobu podle vynálezu je možnost kontinuální výroby kyseliny L-asparagové principiálně například tak, že se katalyzátor suspenduje v roztoku substrátu v reakční nádobě, jejíž dno je odděleno semipermeabilním materiálem, s výhodou semipermeabilní membránou vhodné porozity, například z acetátu celulozy s průměrnou distribucí velikosti pórů 0,5 až 1,0 μm, načež po dosažení kvantitativní konverze substrátu na produkt při nepřetržitém míchání či proudění kapaliny, se reguluje přítok čerstvého substrátu tak, aby pod membránou odebíraná reakční kapalina byla kvantitativně zreagována. Ab se póry semipermeabilní membrány neucpávaly sedimentujícími katalyzátorem, lze upravit například horizontální polohou reaktoru s bočním odsáváním za intenzivního míchání reakční směsi nebo umístěním lopatky míchadla těsně nad plochu membrány. Jsou samozřejmě možné i jiné konstrukční úpravy.

Katalyzátor na bázi zesíťených a permeabilizovaných buněk je stabilní nejméně 6 měsíců, zvláště je-li skladován ve formě vodné suspenze v přítomnosti 1 M fumaranu amonného při teplotě 1 až 15 °C.

Pro kontinuální způsob enzymové výroby kyseliny L-asparagové je zvláště výhodné použití katalyzátoru na bázi navzájem chemicky vázaných buněk s aspartázovou aktivitou /aspartát-amoniak-lyázovou aktivitou/, připraveného známým způsobem/ čs. autorské osvědčení č. PV 5145-79/. Tento katalyzátor má výhodné sedimentační a hydrodynamické vlastnosti a je použitelný ve sloupci ve formě pevného nebo fluidního lože, kterým protéká vodný roztok fumaranu amonného, přičemž stupeň konverze lze regulovat množstvím náplně katalyzátoru a průtokovou rychlostí substrátu. Ke kontinuální výrobě lze rovněž pou-

žit kontinuální míchaný reaktor, popřípadě kaskádu kontinuálních míchaných reaktorů zapojených vedle sebe.

Pro způsob enzymové výroby kyseliny L-asparagové podle vynálezu lze používat různých mikrobiálních druhů a kmenů syntetizujících enzym aspartázu / aspartát-amoniak-lyázu/, například různých kmenů z rodů *Alcaligenes*, *Escherichia* a *Corynebacterium*, popřípadě vysoko-produkčních mutantů různých mikroorganismů.

K produkci mikrobiálních buněk tvořících výchozí materiál pro katalyzátor s aspartázovou aktivitou jsou výhodné jako hlavní složky živných půd hydrolyzáty rostlinných nebo živočišných hmot, zejména hydrolyzáty arašidové nebo sojové mouky, popřípadě pankreatických zbytků, které mohou nahradit drahé suroviny, jako je pepton, hovězí extrakt, bujon apod. Rostlinné hydrolyzáty stimulují biosyntézu aspartázy během submerzní kultivace produkčních mikroorganismů ve stejném rozsahu jako drahé suroviny živočišného původu.

Následující příklady provedení způsob podle vynálezu pouze ilustrují, ale nijak neomezuji na látky, zařízení, postup nebo podmínky v nich uvedené.

Příklad 1

a/ Produkční kmen *Alcaligenes metalcaligenes* byl z čerstvého šikmého agarů naočkován do deseti 500 ml výrých baněk obsahujících po 100 ml sterilní živné půdy tohoto složení/hmotnost / objem / : 4 % pepton technický, 0,1 % kvasničný extrakt, 0,5 % prim.fosforečnan draselný, 0,05 % kryst.síran hořečnatý, pH 7,2 . Kultivace vegetativního inokula probíhala na rotační třepačce 16 hodin při teplotě 28 °C. Potom bylo inokulum z baněk sterilně slito a připraveno k inokulaci fermentačního tanku.

b/ Produkční kmen *Corynebacterium* sp. byl z čerstvého šikmého agarů naočkován do deseti 500 ml varných baněk obsahujících po 100 ml sterilní živné půdy stejného složení jako výše; rovněž podmínky a provedení kultivace byly stejné. Získané inokulum bylo též sterilně slito a připraveno k inokulaci fermentačního tanku.

c/ Produkční kmen *Escherichia coli* byl obdobně jako výše naočkován do deseti 500 ml varných baněk obsahujících po 100 ml sterilní živné půdy stejného složení jako výše. Podmínky kultivace byly shodné s předchozími s tím rozdílem, že kultivační teplota byla 37 °C. Získané inokulum bylo po slití připraveno k inokulaci fermentačního tanku.

Získanými inokuly bylo naočkováno 150 litrů sterilní živné půdy ve 200litrových fermentačních tancích, jež měla toto složení /hmotnost / objem / : 4 % pepton technický, 0,1 % kvasničný extrakt, 0,5 % prim.fosforečnan draselný, 0,05 % kryst.síran hořečnatý. Hodnota pH půdy byla před sterilizací upravena čpavkovou vodou na 7,1. Do tanku očkovaného inokulem *E.coli* byl přidán sterilní roztok amonné soli kyseliny glutamové o počáteční koncentraci 0,5 % hmotnost / objem.

Kultivace produkčních mikroorganismů probíhala za míchání 300 ot/min a vzdušnění 40 litrů vzduchu/min, při teplotě 28 °C po dobu 9 hodin. Kultivace *E.coli* probíhala při teplotě 37 °C. Po ukončení kultivace byly nativní buňky odstředěny, získané pasty zváženy, stanovena jejich sušina a jejich enzymová aktivita.

Produkční kmen	<i>Alcaligenes metalcaligenes</i>	<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Escherichia coli</i>
Vlhká hmota nat. buněk / g/	2680	2240	2400
Specifická aktivita +/ nat.buněk /g vlhké hmoty/	496	232	360

213 127

Produkční kmen	<i>Alcaligenes metalcaligenes</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Escherichia coli</i>
Specifická aktivita /+/ nat.buněk /j/g suché hmoty /	2000	1160	1800

/+/ Jednotka enzymové aktivity aspartázy je takové množství enzymu, které při teplotě 37°C, pH 8,5 a počáteční koncentraci substrátu 1 M vytvoří z fumaranu amonného 1/umol kyseliny L-asparagové za minutu v podmínkách reakční kinetiky nultého řádu. Koncentrace kyseliny L-asparagové byla stanovena chromatografií na tenké vrstvě silikagelu, kvantitativně denzitometrickým vyhodnocením a manometricky, za použití technického preparátu dekarboxylázy kyseliny L-asparagové získaného z buněk *Mycobacterium sp.*

Získaná vlhká buněčná pasta každého z použitého mikrobiálního producenta aspartázy byla v množství po 1 kg rozmíchána odděleně v 3,3 litru vody s přísadou 0,5 mg/ml kryst. síranu hořečnatého, takže vznikly homogenní suspenze s obsahem buněk 0,3 kg/litr. pH suspenzí bylo za míchání upraveno 20% roztokem hydroxidu sodného na 7,0 a byl přidán 25% vodný roztok glutardialdehydu tak, aby jeho výsledná koncentrace v suspenzích činila 0,5 % obj. Reakční směsi byly nepřetržitě míchány po dobu 60 minut při teplotě místnosti, potom byly zředěny přidáním pitné vody na objem asi 35 litrů, promíchány a zesíťené buňky byly odstředěny odděleně do formy vlhkých past.

Získané pasty byly odděleně suspendovány v 3 až 4 litrech pitné vody na homogenní suspenze, ke kterým byl přidán kryst. síran hořečnatý do koncentrace 1 mg/ml, síran amonný do koncentrace 0,5 ml/litr a neionogenní tenzid do hmotnostní koncentrace 0,1 %; pH suspenzí bylo za míchání upraveno 25% čpavkovou vodou na hodnotu 8,5 a suspenze ve vodní lázni vytemperovány na 30 °C a při této teplotě míchány 3 hodiny. Po této době byly suspenze zředěny desetinasobným objemem pitné vody, promíchány a zesíťené, permeabilizované a aktivované buňky byly odstředěny do formy vlhkých buněčných past.

Po 100 g získané buněčné pasty každého mikrobiálního producenta bylo suspendováno v litru 1 M vodného roztoku fumaranu amonného s přísadou hořečnatých iontů, obsahujícího 0,1 % obj.neionogenního tenzidu, s hodnotou pH 8,5 /čpavková voda/. Suspenze byly míchány při teplotě 37 °C ke 100% konverzi substrátu na produkt /teorie 133,1 mg/ml kyseliny L-asparagové/ došlo u *A.metalcaligenes* za 2 hodiny, u *E.coli* za 2,5 hodiny a *Corynebacterium sp.* za 3 hodiny. Po těchto reakčních dobách byly jednotlivé reakční směsi odstředěny, sedimenty suspendovány ve stejném objemu substrátu jako v cyklu předchozím/ 1 litr/ a za stejných reakčních podmínek byly konverze opakovány celkem 13x se stejnou násadou katalyzátoru, přičemž průměrná účinnost konverze byla 99,4 % teorie. Ze supernatantů byla izolována kyselina L-asparagová zahřátím na 90 °C, úpravou pH 60% kyselinou sírovou na hodnotu 2,8 a ochlazením. Celkový výtěžek kyseliny L-asparagové činil 1643 g, tj. 95 % teorie. Při kontrolním provedení opakované enzymové konverze substrátu na produkt s použitím nativních buněk těchto producentů aspartázy za stejných reakčních podmínek bylo dosaženo v druhém cyklu 75 % a ve třetím cyklu méně než 50 % konverze, přičemž buňky ve třetím cyklu byly již silně autolyzovány.

Příklad 2

Stejně jako v příkladu 1 bylo připraveno inokulum kmene *A.metalcaligenes*, určené k inokulaci půdy ve fermentoru objemu 1 m³; do fermentoru bylo naplněno 800 litrů půdy tohoto složení: 240 litrů kyselého hydrolyzátu arašidové mouky s přísadou 0,5 % hmotn.prim.fosforečnanu draselného bylo zředěno pitnou vodou a pH upraveno čpavkovou vodou na hodnotu 7,2.

Po sterilizaci / 120 °C, 30 minut / byla živná půda ochlazená na 28 °C, asepticky přidán roztok 400 g kryst.síranu hořečnatého ve 2 litrech vody a půda naočkována připraveným vegetativním inokulem *A.metalcaligenes*. Kultivace probíhala 16 hodin při teplotě 28 °C,

za míchání 300 ot/min a vzdušnění 300 litrů/min. Po ukončení kultivace byly buňky odstředěny do formy vlhké pasty. Byla získána 10 kg vlhké pasty nativních buněk/ 2,5 kg sušiny /; specifická aktivita činila 400 j/min/g vlhké hmoty, resp. 1800 j/min/g sušiny buněk.

10 kg vlhké buněčné pasty byla homogenně suspendována ve 33 litrech pitné vody, pH bylo upraveno 20% roztokem hydroxidu sodného na 7,0, za míchání byl přidán 25% vodný roztok glutardialdehydu do koncentrace 0,5 % /hmotnost/ objem/. Zesíťování buněk trvalo 60 minut při teplotě místnosti za stálého míchání. Potom byla suspenze zředěna 350 litry pitné vody a buňky byly izolovány odstředěním. Bylo získáno 9,6 kg vlhké hmoty zesíťovaných buněk o specifické aktivitě 136 j/min/g vlhké hmoty.

Celé množství zesíťovaných buněk bylo suspendováno v 1,35 M vodném roztoku fumaranu amonného na celkový objem 30 litrů, pH upraveno na 8,5, obsah síranu hořečnatého na 1 mg/ml a přidán neionogenní tenzid v množství 0,1 % /hmotnost/objem/. Po dobu 48 hodin probíhala při teplotě 30 °C permeabilizace a aktivizace suspenze zesíťovaných buněk. Poté byly buňky odstředěny do formy vlhké pasty. Bylo získáno 7,1 kg vlhké buněčné pasty zesíťovaných, permeabilizovaných a aktivovaných buněk o specifické aktivitě 350 j/min/g vlhké hmoty. Ze supernatantu byla izolována kyselina L-asparagová ve výtěžku 85 % teorie. Poněvadž produkt nebyl čistý, byl rekrystalován a bylo získáno 79,6 % teorie čisté kyseliny L-asparagové.

Získaná buněčná pasta byla dále použita k semikontinuální výrobě kyseliny L-asparagové.

Do stolitrového reaktoru bylo předloženo 95 litrů 1,35 M vodného roztoku fumaranu o pH 8,5, obsahujícího 1 mg/ml síranu hořečnatého. Roztok substrátu byl za míchání vytemperován na 37 °C a přidáno 5 kg vlhké hmoty buněčného katalyzátoru. Po 3 hodinách reakce za míchání byl fumaran amonný/kvantitativně konvertován na aspartát amonný/teoretický výtěžek 179, 7 mg/ml kyseliny L-asparagové/. Po první skončené konverzi byl katalyzátor oddělen odstředěním a znovu použit pro enzymovou transformaci fumaranu amonného, celkem 20krát, přičemž vždy po pátém cyklu bylo doplněno 0,5 kg pasty katalyzátoru k náhradě manipulačních ztrát. Ze supernatantu byla izolována postupem podle příkladu 1 kyselina L-asparagová s celkovým výtěžkem 90 % teorie a obsahem účinné látky 99,7 % hmotn.

Příklad 3

290 g vlhké hmoty chemicky vázaných buněk s aspartázovou aktivitou připravených podle čs. autorského osvědčení č. /PV 5145-79/, bylo naplněno do skleněného sloupce o velikosti 6 x 20 cm, vybaveného temperovaným pláštěm. Konverze substrátu na produkt byla prováděna kontinuálním způsobem. Rychlostí 150 ml/h protékal sloupcem 1 M vodný roztok fumaranu amonného o pH 8,5, obsahující 1 mg/ml síranu hořečnatého. Kapalina vtékající do sloupce s pevným ložem katalyzátoru/průtok shora dolů/i vlastní sloupec byly temperovány na 37 °C. Po průtoku sloupcem bylo dosaženo za uvedených podmínek kvantitativní konverze fumaranu amonného na aspartát amonný/133,1 mg/ml kyseliny L-asparagové/a výtěžek izolované kyseliny L-asparagové činil 88 % teorie, s obsahem účinné látky 99,8 % hmotn. V průběhu 110 hodin /5 dnů/ nepřetržitého provozu/sloupcem protéklo 16,5 litru substrátu, který byl konvertován na produkt se 100% účinností/nebyl pozorován pokles specifické aktivity katalyzátoru.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob enzymové výroby kyseliny L-asparagové vyznačující se tím, že se vodný roztok fumaranu amonného o koncentraci 0,05 až 1,5 mol/litr, s výhodou 1,35 mol/litr, s hodnotou pH 6,5 až 9,5, s výhodou 8,5, s přísadou kationtů hořčíku a popřípadě s přísadou neionogenního tenzidu, uvádí při teplotě 10 až 50 °C, s výhodou 35 až 38 °C, diskontinuálně, semikontinuálně nebo kontinuálně ve styk s katalyzátorem na bázi zesíťované a permeabilizované, popřípadě aktivované biomasy mikrobiálního producenta aspartázy nebo na bázi navzájem chemicky vázaných buněk tohoto producenta, načež se po ukončené konverzi izoluje z odděleného kapalného podílu kyselina L-asparagová.