



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202929
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 15/00

(22) Přihlášeno 09 03 79
(21) (1599-79)

(40) Zveřejněno 30 05 80

(45) Vydáno 15 11 82

(75)

Autor vynálezu

NETRVAL JIŘÍ dr., VOJTÍŠEK VLADIMÍR dr. CSc.,
SOUHRADA JOSEF dr., ČULÍK KAREL dr., PRAHA,
CECHNER VÁCLAV ing., ROZTOKY U PRAHY,
HILBERT OTTO ing. a JAKL VLADIMÍR, PRAHA

- (54) Způsob selekce kmenů kvasinek transformujících benzaldehyd na D-(—)-1-fenyl-1-hydroxy-2-propanon pro výrobu L-(—)-erythro-1-fenyl-2-methylamino-1-propanolu a produkční kmen mikroorganismu *Saccharomyces coreanus* CCM 3395

1

Vynález se týká způsobu selekce kmenů kvasinek transformujících benzaldehyd na D-(1)-1-fenyl-1-hydroxy-2-propanon pro výrobu L-(-)-erythro-1-fenyl-2-methylamino-1-propanolu a produkčního kmene mikroorganismu *Saccharomyces coreanus* CCM 3395.

Je známo, že D-(-)-1-fenyl-1-hydroxy-2-propanon [D-(-)-fenylacetylmethanol, dále pro stručnost jen FAM] slouží jako výchozí surovina pro výrobu L-(-)-erythro-1-fenyl-2-methylamino-1-propanolu (dále pro stručnost jen L-efedrin). Vedle chemického způsobu přípravy FAM, který poskytuje racemickou směs L a D izomerů FAM, je vzhledem ke své stereospecifitě výhodnější použít biochemického způsobu přípravy D-(-)-FAM tzv. Nebergovou metodou, tj. dávkováním benzaldehydu k suspenzi kvasinek obsahujících cukr, především sacharózu (Neberg, Biochem. Ztschr., 115, 282, 1921). Od prvních Nebergových poznatků byl tento postup detailně rozpracován a stal se předmětem řady teoretických prací; z poslední doby např. práce Voetse et al. [Ztschr. für Allg. Mikrobiol., 13, 355, 1973]. Z literárních údajů vyplývá následující představa o biochemickém mechanismu tvorby D-(-)-FAM: Sekvencí enzymových reakcí zvaných glykolyza je konvertován příslušný cukr, převáž-

2

ně sacharóza, na pyrohroznovou kyselinu. Tato kyselina je dekarboxylována enzymem pyruvát dekarboxylázou za vzniku acetaldehydu a kyslíčnicku uhličitého. Vznikající acetaldehyd v aktivní formě (in statu nascendi) kondenzuje s externě přidaným benzaldehydem za vzniku D-(-)-FAM; reakce je naprosto stereospecifická. Reakční rychlost pak závisí na poměru vnitrobuněčné koncentrace kyseliny pyrohroznové (substrátu) a enzymu pyruvát dekarboxylázy.

V patentové literatuře je využití kvasinek transformujících benzaldehyd na D-(-)-FAM pro výrobu L-(-)-efedrinu prvně popsáno v roce 1934 v USA v patentovém spisu č. 1 956 950. Z poslední doby pak v NDR v patentovém spisu č. 51 651 z roku 1966.

Odborná i patentová literatura popisuje pro biotransformaci benzaldehydu na D-(-)-FAM pro výrobu L-(-)-efedrinu výhradně použití pekařského nebo pivovarského droždí, tj. kvasinek různých kmenů druhů *Saccharomyces cerevisiae* nebo *Saccharomyces carlsbergensis*, respektive podle novějších taxonomických názorů *Saccharomyces uvarum*. Z uvedeného důvodu různé farmaceutické firmy vyrábějící L-(-)-efedrin buď propagují pro uvedený účel tyto druhy, anebo používají odpadní kvasnice po výrobě piva nebo droždí. V tomto smyslu dokonce převa-

žují názory, že např. proces výroby piva a tzv. spodní kvašení poskytuje pivovarským kvasinkám vhodné biochemické vlastnosti pro uvedený účel výroby.

Při selekci sbírkových a přírodních kmenů různých druhů kvasinek podle vynálezu, bylo zpočátku postupováno tak, že suspektní kmeny byly vybírány podle specifické aktivity enzymu pyruvát dekarboxylázy; ukázalo se však, že obsah tohoto enzymu v buňkách různých druhů a kmenů kvasinek je jen v nepřímém vztahu k produkci D-(-)-FAM, neboť i když byly nalezeny kmeny s vysokou specifickou aktivitou tohoto enzymu, produkce nejenže nebyla vyšší nebo stejná, nýbrž často nižší ve srovnání s kontrolními kmeny. Z naznačených skutečností bylo uzavřeno, že musí existovat vhodný poměr mezi vnitrobuněčnou koncentrací pyrohroznové kyseliny a množstvím enzymu tak, aby dané množství enzymu v buňkách bylo dostatečně saturováno substrátem a tak mohl vysokou rychlostí vznikat aktivní acetaldehyd schopný kondenzace s externě přidaným benzaldehydem na D-(-)-FAM. Tato pracovní hypotéza byla zpětně dokázána externími přísadkami pyrohroznové kyseliny k suspenzím různých kmenů kvasinek s rozdílnou specifickou aktivitou enzymu pyruvát dekarboxylázy spolu s přidáním benzaldehydu; za těchto podmínek byla rychlost tvorby D-(-)-FAM do jisté míry úměrná obsahu enzymu stejně tak jako absolutní výtěžek.

Vzhledem k tomu, že selekce různých kmenů kvasinek nemohla být prováděna ze zcela evidentních důvodů podle individuálních hladin této látky u jednotlivých kmenů (kyselina pyrohroznová je velmi rychle metabolizována, takže stanovení její koncentrace v buňkách by bylo experimentálně i metodicky náročné), byla selekce různých druhů a kmenů kvasinek podle vynálezu prováděna měřením iniciálních rychlostí tvorby D-(-)-FAM po jednorázové dávce benzaldehydu v rozsahu koncentrací 100 až 350 mg/100 ml suspenze buněk 20hodinové kultury. Koncentrace D-(-)-FAM byla stanovena v jediném (stejném) časovém intervalu. Různé kmeny sbírkových a z přírody izolovaných kvasinek byly naznačeným způsobem rozděleny do 4 kategorií: I. kmeny s nulovou produkcí D-(-)-FAM, II. kmeny s nízkou produkcí (1 až 40 mg/100 ml), III. kmeny se střední produkcí (40 až 70 mg/100 ml) a IV. kmeny s vysokou produkcí (více než 70 mg/100 ml). Většina testovaných kmenů náležela do kategorie I (30 % kmenů) nebo IV (42 % kmenů); méně kmenů náleželo do kategorie II (18 % kmenů) a III (10 % kmenů).

Kmeny z kategorie I a II byly z dalšího testování vyřazeny a u kmenů z kategorie III a IV byla prováděna biotransformace po

dobu 2 hodin. Kmeny, u kterých se již během těchto prvních dvou hodin biotransformace zastavila, byly z dalšího testování opět vyřazeny. U zbývajících kmenů různých druhů kvasinek ze suspektního předscreeningu byla sledována celá biotransformace dávkováním benzaldehydu a acetaldehydu spolu s analytickým vyhodnocením rychlosti tvorby D-(-)-FAM a rychlosti spotřeby benzaldehydu, až do úplného zastavení tvorby D-(-)-FAM, spolu s kontrolními kmeny tradičních kvasinek, tj. *Saccharomyces carlsbergensis* a *Saccharomyces cerevisiae*, za jinak stejných (zvolených) podmínek kultivace a biotransformace.

Nejvyšší rychlosti tvorby D-(-)-FAM a jeho výtěžku bylo dosaženo s některými druhy rodů *Candida*, *Hansenula* a *Pichia*, zejména druhy *Candida macedoniensis* a *Hansenula anomala* (560 až 600 mg/100 ml) a druhem *Saccharomyces coreanus* sp. (680 mg/100 mlilitrů). Kontrolními kmeny tradičních kvasinek *S. carlsbergensis* a *S. cerevisiae* bylo dosaženo za jinak stejných podmínek kultivace a biotransformace stejného nebo nižšího výtěžku.

Zjistili jsme tedy, že pro transformaci benzaldehydu na D-(-)-FAM pro výrobu L-(-)-efedrinu podle vynálezu, lze použít jiných druhů kvasinek jak z taxonomicky velice vzdálených rodů, např. rodů *Candida*, *Hansenula* a *Pichia*, tak jiných druhů z rodu *Saccharomyces*, nepatřících taxonomicky k druhům *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces carlsbergensis*, tedy droždářenským (pekařským) a pivovarským kvasinkám. Navíc u některých netradičních druhů kvasinek byla nalezena vyšší iniciální rychlost tvorby D-(-)-FAM, vyšší stechiometrické využití konverze benzaldehydu na D-(-)-FAM, kratší generační doba během růstu a nižší množství buněčné hmoty potřebné k stejné nebo vyšší konverzi (výtěžku) ve srovnání s tradičními kmeny droždářských nebo pivovarských kvasinek za jinak stejných reakčních podmínek.

Nejlepší izoláty netradičních kmenů kvasinek byly postupem podle vynálezu vystaveny přítomnosti benzaldehydu nebo acetaldehydu či kombinaci obou látek, s cílem selekce mutant, které by vykazovaly vyšší rezistenci k toxickému účinku obou látek a které by měly z hlediska výrobního procesu výhodnější vlastnosti. Naznačeným způsobem byl získán vysokoprodukční kmen *Saccharomyces coreanus* CCM 3395, který ve srovnání s tradičním kmenovým materiálem pivovarských a droždářských kvasnic a ve srovnání s rodičovským kmenem má následující výhodné vlastnosti pro výrobu L-(-)-efedrinu; výsledky a srovnání jsou uvedeny v následující tabulce.

Kmen	<i>S. carlsbergensis</i> (pivovarské kvas.)	<i>S. cerevisiae</i> (droždár. kvas.)	<i>S. coreanus</i> (rodič. kmen)	CCM 3395 (mut. kmen)
Produkce D-(-)-FAM (mg/100 ml)	600—750	650—800	680—830	900—1300
Spotřeba benzaldehydu (%)	0,80—0,90	0,80—0,95	0,85—0,90	0,90—1,4
Spotřeba acetaldehydu (%)	0,3—0,4	0,3—0,4	0,1—0,3	—
Spotřeba sacharózy pro propagaci a biotransformaci (%)	6,5—7,1	6,5—7,25	6,0—6,75	6,25—7,25
Suchá hmota buněk (%)	1,6—2,0	1,5—2,0	0,35—0,4	0,35
Obsah L-(-)-efedrinu ve vodné fázi po hydrogenaci (%)	85,0—87,5	85,0—88,0	87,5—88,5	87,5—90,0

Předmětem vynálezu je způsob selekce kmenů mikroorganismů, zejména kvasinek, transformujících benzaldehyd na D-(-)-1-fenyl-1-hydroxy-2-propanon pro výrobu L-(-)-erythro-1-fenyl-2-methylamino-1-propanolu, vyznačující se tím; že výchozí produkční kmen mikroorganismu se vystaví pasážování v tekuté nebo na pevné živné půdě obsahující benzaldehyd a/nebo acetaldehyd, přičemž při kultivaci v tekuté živné půdě se vybírají mutanty s konstantní růstovou rychlostí, při kultivaci na pevné živné půdě se vybírají největší kolonie, načež se získané mutanty izolují ve formě monokoloniových izolátů.

Vynález je dále vyznačený tím, že pro výrobu se použije kvasinek rodů *Candida*, *Hansenula* a *Pichia*, zejména druhů *Candida macedoniensis* a *Hansenula anomala* a jiných druhů a kmenů rodu *Saccharomyces*, než jsou druhy a kmeny *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces carlsbergensis*.

Předmětem vynálezu je dále kmen mikroorganismu *Saccharomyces coreanus* CCM 3395, vyznačující se tím, že produkce D-(-)-1-fenyl-1-hydroxy-2-propanonu se pohybují v rozmezí 900 až 1300 mg/100 ml sterilně nebo nesterilně propagované kultury během biotransformace benzaldehydu v nepřítomnosti acetaldehydu v reakční směsi, přičemž nízký obsah vedlejších produktů biotransformační reakce umožňuje dosáhnout vysoké čistoty výchozího meziproductu a v důsledku toho vysoké procento konverze při jeho následné reduktivní aminaci s výtěžkem L-(-)-erythro-1-fenyl-2-methylamino-1-propanolu 87 až 90 % teorie.

Dále je vynález blíže objasněn v příkladech provedení, aniž by se jimi omezoval.

Příklady provedení

Příklad 1

Různé kmeny kvasinek náležející většímu počtu druhů zejména z rodů *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces* a *Saccharomyces*, byly ze šikmých agarů obsahujících 10 % sladiny a 2 % agaru postupně očkované kličkou do 500ml varných baněk, obsahujících 150 ml živné půdy následující-

ho složení (koncentrace uvedeny v procentech hmota/objem):

Kukuřičný extrakt	5,0
Sacharóza	3,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,56
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,19
KH ₂ PO ₄	0,06
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,05

Kultivace probíhala při teplotě 28 °C po dobu 24 hodin na rotačním třepacím stroji o počtu otáček 240/min.; pH živné půdy na počátku kultivace bylo 6,1 až 6,3. Po této době vyrostlé suspenze buněk byly přeočkovány (1 objemové procento inokula) do baněk obsahujících živnou půdu stejného složení (II. generace) a kultivace probíhala za uvedených podmínek po dobu 22 hodin.

Po této době bylo do každé z kultur postupně přidáno 2,5 % sacharózy, 0,1 % acetaldehydu a 0,35 % benzaldehydu; kultury byly umístěny na rotační třepací stroj a po uplynutí 30 minut byla v baňkách polarimetricky stanovena koncentrace vytvořeného D-(-)-FAM. U všech testovaných kmenů byly tímto způsobem zjištěny hodnoty produkce D-(-)-FAM ve 30. minutě biotransformace v rozmezí od 0 do 140 mg/100 ml kultury. Kmeny, u kterých byla za popsaných podmínek produkce nulová nebo nižší než 40 mg/100 ml, byly z dalšího testování vyřazeny; šlo asi o 50 % testovaných kmenů.

U kmenů kvasinek, které v předchozích etapách testování vykazovaly střední nebo vysokou produkci D-(-)-FAM, byl sledován celý proces biotransformace. Suspektní kmeny mikroorganismů byly po 2 generace kultivovány v baňkách na rotačním třepacím stroji za uvedených podmínek a ve zmíněné živné půdě. Při vlastní biotransformaci pak byla do baněk s různými kulturami přidávána sacharóza a benzaldehyd. Do kultur byl rovněž přidáván acetaldehyd postupem popsaným pro droždářské (pekařské) a pivovarské kvasnice (D. Gröger et al., Zeits. für Allg. Mikrobiol., 6, 275, 1966). Uvedené sloučeniny byly v několika dávkách přidávány ke kulturám podle následujícího schématu (koncentrace jsou uvedeny v procentech hmota/objem):

Dávka Sacharóza Benzaldehyd Acetaldehyd

1	2,5	0,35	0,1
2	0,5	0,15	0,075
3 a další	0,5	0,1	0,05

Ve 30minutových intervalech byla polarograficky měřena koncentrace benzaldehydu a polarimetricky koncentrace D-(-)-FAM. Další dávka byla vždy přidávána tehdy, když koncentrace benzaldehydu v suspenzi poklesla pod 0,05 %. Jako kontrolních kmenů bylo použito droždářských (pekařských) a pivovarských kvasinek *S. cerevisiae* a *S. carlsbergensis*.

Tímto způsobem bylo z testovaných 83 suspektních kmenů různých druhů kvasinek vybráno několik kmenů, u kterých bylo možno popsáním způsobem dosáhnout produkce D-(-)-FAM kolem 600 mg/100 ml; u většiny ostatních kmenů nepřesahovala produkce D-(-)-FAM 400 mg/100 ml. Po reprodukci měření rychlosti tvorby D-(-)-FAM byly jako nejlepší producenti vybrány 3 kmeny, které taxonomicky patřily k druhům *Candida macedoniensis*, *Hansenula anomala* a *Saccharomyces coreanus* sp. (v *The Yeasts, a taxonomic study*, edit., J. Lodderová, North Holland Publ. Comp., Amsterdam, London, 1970). U těchto kmenů byla rychlost tvorby a celkový výtěžek D-(-)-FAM stejná nebo vyšší ve srovnání s kontrolními kmeny pekařských a pivovarských kvasinek a pohybovala se v rozmezí dosažených hodnot mezi 600 až 800 mg/100 ml.

Příklad 2

Kmeny kvasinek druhů *C. macedoniensis*, *H. anomala* a *S. coreanus* sp., byly ze šikmých agarů naočkovány kličkou do 500ml varných baněk obsahujících 150 ml živné půdy následujícího složení (koncentrace uvedeny v procentech hmota/objem):

Yeast extrakt (Oxoid)	2,0
Sacharóza	3,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,06
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,19
KH ₂ PO ₄	0,06
NH ₄ H ₂ PO ₄	0,05

pH živné půdy se pohybovalo v rozmezí hodnot 6,1 až 6,3. Kultivační podmínky byly jinak stejné, jak je uvedeno v příkladu 1. Po 24 hodinách kultivace byly kmeny přeočkovány do baněk obsahujících tutéž živnou půdu, avšak obsahující navíc benzaldehyd v rozsahu koncentrací 0,07 až 0,2 % nebo acetaldehyd v rozsahu koncentrací 0,1 až 0,3 %, případně byly do baněk přidány obě tyto sloučeniny v různém poměru uvedených koncentrací; množství inokula vnesené do první subkultury činilo 10 objemových procent.

V těchto selektivních živných půdách byly kmeny několikrát pasážovány, a to vždy po

72 hodinách kultivace, přičemž každá následující subkultura byla vždy očkovaná 10 objemovými procenty inokula ze subkultury předcházející. Současně byl v každé ze subkultur sledován přírůstek optické denzity — turbidity buněk (dále jen O. D.) a sledována růstová rychlost v 1n O. D. V některých subkulturách bylo zjištěno zvýšení růstové rychlosti buněk; tyto buněčné populace byly pasážovány tak dlouho, až se růstová rychlost neměnila. Z posledních subkultur byla buněčná populace vyseta na pevnou neselektivní živnou půdu o stejném složení, jak je uvedeno výše, doplněnou 2 % agaru. Několik desítek kolonií bylo vyočkováno na šikmé agary a izoláty testovány na produkci D-(-)-FAM způsobem uvedeným v příkladu 1.

Nejlepší z izolátů odvozené od uvedených druhů kvasinek popsáním způsobem, vykazovaly zvýšenou produkci a lepší stechiometrickou konverzi benzaldehydu na D-(-)-FAM a vyšší stupeň resistance k toxickému účinku benzaldehydu. Nejlepší izolát odvozený od kmene *S. coreanus* sp., dosáhl v laboratorních podmínkách produkci mezi 800 až 900 mg D-(-)-FAM/100 ml buněčné suspenze.

Příklad 3

Izolát kmene kvasinky *S. coreanus* sp., získaný, jak je uvedeno v příkladu 2, byl ze šikmého agaru naočkován kličkou do 500ml varné baňky obsahující 150 ml živné půdy, jejíž složení je uvedeno v příkladu 1 s tím rozdílem, že půda obsahovala namísto 5,0 % kukuřičného extraktu pouze 3 % této látky. Podmínky kultivace inokula byly rovněž stejné, jak je uvedeno v příkladu 1. Z této I. vegetativní generace inokula bylo očkováno 1 objemové procento do další baňky plněné živnou půdou stejného složení. Po 20 hodinách růstu bylo a 40 ml inokula II. vegetativní generace nalito do dvou skleněných nádob o celkovém objemu 5 litrů plněných 4 litry nesterilní živné půdy stejného složení. Kultivace probíhala nesterilním způsobem 22 hodin za nepřetržitého míchání ocelovým vrtulovým míchadlem a nepřetržitého vzdušnění v obou nádobách; rychlost otáček 260/min., vzdušnění 1 litr vzduchu/min. (0,25 pracovního objemu nádoby) při teplotě 28 °C.

Poté byla v obou nádobách provedena biotransformace benzaldehydu na D-(-)-FAM; do první nádoby byla dávkována pouze sacharóza a benzaldehyd, do druhé nádoby sacharóza, benzaldehyd a acetaldehyd, jak je uvedeno v příkladu 1. Biotransformace byla prováděna při teplotě 28 až 29 °C za nepřetržitého míchání a vzdušnění jako kultivace; podmínky jsou uvedeny výše. Výsledky biotransformace jsou uvedeny v následujících tabulkách (I a II).

Z výsledků uvedených v obou tabulkách vyplývá, že přídavky acetaldehydu do reakční směsi během biotransformace neovlivňují reakční rychlost a výtěžek D-(-)-FAM; průměrný výtěžek se pohyboval kolem 1200 mg D-(-)-FAM/100 ml suspenze/12 hodin při aktuální suché hmotě buněk 6 mg/ml. Po skončení biotransformace byly buň-

ky odděleny filtrací a D-(-)-FAM byl převeden z vodné do organické fáze vytřepáním octanem butylnatým v poměru vodná fáze : organická fáze 3:1. Z organické fáze byla provedena kvalitativní analýza produktu spolu se standardem D-(-)-FAM plynovou chromatografií. Výsledky potvrdily chemickou identitu produktu.

Tabulka I

Čas (h)	Benzaldehyd (mg/100 ml)	D-(-)-FAM (mg/100 ml)	Sacharóza (g/100 ml)
0	+350	—	+2,5
0,5	214	82	—
1,0	199	153	2,1
1,5	+200	—	+0,25
2,5	132	328	1,65
3,0	+150	—	+0,5
3,45	115	476	—
4,0	+150	—	—
4,5	162	—	—
5,0	108	625	1,35
5,15	+150	—	+0,25
6,0	130	—	—
6,5	+100	—	+0,25
7,0	110	869	1,1
7,15	100	—	+0,25
7,45	136	—	—
8,5	+100	—	—
9,15	100	1050	0,95
9,5	+100	—	+0,25
10,15	130	1130	—
11,15	+ 50	—	—
12,0	95	1210	0,8

(+) přídavek benzaldehydu a sacharózy

Tabulka II

Čas (h)	Benzaldehyd (mg/100 ml)	Acetaldehyd (mg/100 ml)	D-(-)-FAM (mg/100 ml)	Sacharóza (g/100 ml)
0	+350	+100	—	+2,5
0,5	226	—	80	—
1,0	156	—	172	2,05
1,5	+200	+100	—	+0,25
2,5	168	—	354	1,75
3,15	+150	+75	—	+0,5
4,0	136	—	536	—
4,5	+150	+75	—	—
5,0	155	—	653	1,2
5,5	114	—	—	+0,25
6,0	+150	+75	—	+0,25
7,0	105	—	879	1,3
7,15	+100	+50	—	—
8,0	119	—	—	—
8,5	+100	+50	—	+0,25
9,15	115	—	1050	1,1
9,45	+100	+50	—	+0,25
10,5	134	—	1130	—
11,5	+ 50	+50	—	—
12,0	130	—	1190	1,1

(+) přídavek benzaldehydu, acetaldehydu a sacharózy

Příklad 4

Do nerezového fermentačního tanku o celkovém objemu 100 litrů bylo připraveno 80 litrů nesterilní živné půdy s 3 % sušeného kukuřičného extraktu; ostatní složky živné půdy jsou uvedeny v příkladu 1. 20 baněk II. vegetativní generace inokula izolátu kmeny kvasinky *S. coreanus* sp. bylo připraveno, jak je uvedeno v příkladu 3. Tímto inokulem byl naočkován fermentační tank a kultivace probíhala při teplotě 28 až 29 °C nesterilním způsobem při vzdušnění $\frac{1}{4}$ pracovního objemu fermentoru (20 litrů/min.) za míchání turbínovým míchadlem s šesti lopatkami o průměru 160 mm při rychlosti otáček 190/min. Fermentační tank byl opatřen jednou zarážkou. Po 22hodinové nesterilní kultivaci byla provedena biotransformace benzaldehydu na D-(-)-FAM dávkováním benzaldehydu a sacharózy bez přídavku acetaldehydu způsobem uvedeným v tabulce I příkladu 3 za nepřetržitého míchání a vzdušnění.

Bylo získáno celkem 1100 mg D-(-)-FAM/100 ml kultury za 12 hodin biotransformace při celkové spotřebě cukru na propagaci a biotransformaci 7,25 % a celkové spotřebě benzaldehydu 1,35 %. Dále bylo provedeno další zpracování D-(-)-FAM na L-(-)-efedrin následujícím postupem s následující výtěžností:

80 litrů fermentační půdy bylo separací na odstředivce zbaveno suspenzních podílů, supernatant byl vyčištěn filtrací přes vrstvu křemeliny. 78 litrů čirého filtrátu s obsahem 1100 mg/100 ml, tj. celkem 858 g D-(-)-FAM, bylo extrahováno 39 litry octanu butylnatého a směs byla gravitačně oddělena. Bylo získáno 37 litrů extraktu s účinností 2180 mg/100 ml, tj. celkem 806 g D-(-)-FAM. Extrakt byl po částech zahuštěn za vakua na oběhové odparce na konečných 1300 g tak, aby teplota brýdových par nepřekročila 75 °C. Zahuštěný koncentrát obsahoval celkem 800 g D-(-)-FAM. Po provedení zkoušek zpracovatelnosti byl získaný materiál podroben reduktivní aminaci za použití speciálního katalyzátoru na bázi Pt. Po ukončení reakce a po oddělení katalyzátoru z reakční směsi byla provedena extrakce bází L-aD, L-efedrinu do zředěného roztoku kyseliny chlorovodíkové. Vodný roztok L-aD, L-efedrin.HCl, který obsahoval 960 g L-efedrinu.HCl z úhrnného množství 1020 g efedrinů.HCl, byl po vyčištění filtrací vakuově zahuštěn ke krystalizaci. Po krystalizaci, separaci a promytí bylo získáno 790 g substance s obsahem 98,6 % L-(-)-erythro-1-fenyl-2-methylamino-1-propanolu.HCl, matečné louhy obsahovaly 150 g L-efedrinu.HCl a 45 g D, L-efedrinu.HCl.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob selekce kmenů mikroorganismů, zejména kvasinek, transformujících benzaldehyd na D-(-)-1-fenyl-1-hydroxy-2-propanon pro výrobu L-(-)-erythro-1-fenyl-2-methylamino-1-propanolu, vyznačující se tím, že výchozí produkční kmen mikroorganismu se vystaví pasážování v tekuté nebo na pevné živné půdě obsahující benzaldehyd a/nebo acetaldehyd, přičemž při kultivaci v tekuté živné půdě se vybírají mutanty s konstantní růstovou

rychlostí, při kultivaci na pevné živné půdě se vybírají největší kolonie, načež se získané mutanty izolují ve formě monoklonio-vých izolátů.

2. Kmen mikroorganismu *Saccharomyces coreanus* CCM 3395, získaný podle bodu 1, produkující D-(-)-1-fenyl-1-hydroxy-2-propanon v množství 900 až 1300 mg/100 ml sterilně nebo nesterilně propagované kultury během biotransformace benzaldehydu.