



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

259996

(11) B₁

(51) Int. Cl.⁴

C 12 P 37/00

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 30.04.87
(21) PV 3060-87.Q

(40) Zveřejněno 15.03.88

(45) Vydáno 11.05.89

(75)

Autor vynálezu

VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc.,
KRUMPHANZL VLADIMÍR člen korespondent ČSAV,
HUŇKOVÁ ZDENKA RNDr. CSc., PRAHA,
JAKUBOVÁ ANTÓNIA ing.,
BUČKO MICHAL ing. DrSc.,
MIKLÁŠ EMIL ing., BANSKÁ BYSTRICA,
ČULÍK KAREL RNDr., PRAHA

(54)

Způsob enzymové výroby 6-aminopenicilánové kyseliny
z fenoxymethylpenicilinu stabilizovanými bunkami
kvasinek

Řešení se týká způsobu výroby 6-aminopenicilánové kyseliny (6-APK) z fenoxymethylpenicilinu (V-penicilin) stabilizovanými bunkami kvasinek, které je vyznačeno tím, že se enzymová hydrolýza provádí suspenzí kvasinek obsahujících V-penicilin amidázu, zejména suspenzí buněk kvasinky *Cryptococcus* sp. CCY 17-22-1, předem chemicky stabilizovaných působením bifunkčního činidla jako jsou dialdehydy dikarboxylových kyselin, s výhodou působením glutaraldehydu, a předem vypraných roztoky anorganických solí silných kyselin a/nebo zásad, s výhodou síranem amonným, a s použitím roztoku fenoxymethylpenicilinu v koncentraci 1 až 10 %, s výhodou 4 až 7 % hmota/objem, při pH 7,0 a 8,5, s výhodou 8,0, při teplotě 10 až 45 °C, s výhodou 37 °C, v míchaném reaktoru a po ukončení hydrolýzy a ochlazení reakční směsi na teplotu 0 až 5 °C se suspenze stabilizovaných a vypraných kvasinek oddělí a použije k hydrolýze čerstvé násoady roztoku fenoxymethylpenicilinu a ze supernatantu, popřípadě z matečného louhu se po úpravě pH a teploty izoluje 6-aminopenicilánová kyselina, popřípadě regeneruje fenoxycetová kyselina, přičemž se enzymová hydrolýza fenoxymethylpenicilinu a izolace 6-aminopenicilánové kyseliny, popřípadě regenerace fenoxycetové kyseliny alespoň dvakrát opakuje.

Vynález se týká enzymové výroby 6-aminopenicilánové kyseliny z fenoxymethylpenicilinu stabilizovanými buňkami kvasinek.

6-aminopenicilánová kyselina (dále jen 6-APK) slouží jako meziprodukt farmaceutické výroby pro přípravu tzv. polosyntetických penicilinů, zejména ampicilinu. 6-APK lze připravit buď chemicky, nebo enzymově. Enzymová příprava 6-APK je však ekonomicky podstatně výhodnější. Pro její výrobu se u řady farmaceutických firem jako výchozí suroviny používá tzv. přírodních penicilinů, G-penicilinu (benzylpenicilinu) nebo V-penicilinu (fenoxymethylpenicilinu) za použití G- nebo V-penicilinamidáz (penicilinacyláz), které jsou do určité míry substrátově specifické, podle typu postranního řetězce přírodních penicilinů (N-fenylacetyl- resp. N-fenoxycetyl-6-APK). Zdrojem těchto enzymů jsou obvykle mikrobiální buňky, zejména bakterie, imperfektní houby, (plísňe) a některé druhy vyšších hub (basidiomycety).

Většina farmaceutických firem využívá pro enzymovou výrobu 6-APK především benzylpenicilin jako substrát za použití buď nativních (intaktních) ve většině případů bakteriálních buněk z rodu *Escherichia* nebo *Proteus*, popřípadě rozpustného, výhodněji imobilizovaného enzymu, předem izolovaného z produkčních, vysoce aktivních bakteriálních kmenů.

V československém farmaceutickém průmyslu je využíván tzv. semikontinuální způsob enzymové výroby 6-APK z benzylpenicilinu na bázi chemicky stabilizovaných individuálních buněk bakterií *Escherichia coli* podle čs. autorského osvědčení č. 201 621.

Citovaný způsob spočívá v tom, že bakteriální buňky *E. coli* se oddělí po jejich kultivaci ve fermentačním tanku na zahušťovacích odstředivkách, nakoncentrovaná vodná suspenze bakteriálních buněk se stabilizuje glutaraldehydem, suspenze se promyje vodou a stabilizované buňky se permeabilizují v prostředí chloridu sodného v přítomnosti vhodného tenzidu, načež se promytá vodná

suspenze obsahující individuálně zesítěné a permeabilizované buňky uveďte ve styk s draselnou nebo sodnou solí benzylpenicilinu (G-penicilinu) v míchaném reaktoru a po ukončení enzymové hydrolyzy se suspenze stabilizovaných buněk oddělí odstředěním na zahusťovacích odstředivkách a ze supernatantu se izoluje 6-APK popřípadě regeneruje fenylactová kyselina. Oddělená, nakoncentrovaná vodná suspenze stabilizovaných bakteriálních buněk, obsahující část reakční směsi z předchozího cyklu použití, je opět přecherpána zpět do reaktoru, zředěna vodou, přidán další díl nové násady G-penicilinu a opět zahájen další cyklus enzymové hydrolyzy.

Použití tohoto suspenzního biokatalyzátoru je však omezeno pouze na výrobu 6-APK z benzylpenicilinu (G-penicilinu). Druhý typ přírodního penicilinu, fenoxymethylpenicilin (V-penicilin), který je rovněž v Československu vyráběn, však jako surovinu pro výrobu 6-APK nelze využít, neboť substrátová specifita penicilinamidázy z *E. coli* je více než řádově posunuta ve prospěch hydrolyzy benzylpenicilinu.

Fenoxymethylpenicilin (dále jen V-penicilin) má oproti benzylpenicilinu (dále jen G-penicilin) řadu výhod, které spočívají zejména ve vyšší stabilitě 3-laktamového kruhu tohoto přírodního antibiotika ve vodných roztocích v závislosti na pH a teplotě. Z těchto důvodů lze V-penicilin v humánní a veterinární medicíně aplikovat perorálně na rozdíl od výhradní perenterální opakované aplikace G-penicilinu. Z toho pro výrobu 6-APK vyplývá další výhoda, a to je podstatně nižší přítomnost degradačních produktů V-penicilinu, zejména fenoxymethylpenicilánové kyseliny a z toho resultující lepší kvalita 6-APK a vyšší výtěžek v izolaci. Další výhodou výroby 6-APK z V-penicilinu je i skutečnost, že druhý produkt enzymové hydrolyzy, fenylactová kyselina, má podstatně nižší odór (podstatně méně páchne) ve srovnání s fenylactovou kyselinou, což při velkokapacitní výrobě 6-APK není zanedbatelný společenský a pracovní faktor.

V čs. autorských osvědčeních č. 240 247 a č. 250 495 je popsán způsob selekce mikroorganismů, zejména kvasinek a vysoko-produkční mutantní kmen kvasinky *Cryptococcus* sp. CCY 17-22-1, včetně způsobu jeho submersní fed-batch kultivace ve fermentačním tanku s vysokou aktivitou V-penicilinamidázy, která hydrolyzuje pouze pouze V-penicilin a p-hydroxy-V-penicilin, zatímco G-penicilin nebo ampicilin není hydrolyzován vůbec. Existence tohoto kmene a způsobu výroby enzymově aktivní biomasy tohoto

259996

kmene kvasinky a průkaz o nepathogenitě tohoto kmene na základě hygienicko-epidemiologické expertízy umožňuje navrhnout řešení technologie enzymové výroby 6-APK z V-penicilinu pomocí stabilizovaných buněk.

Způsob enzymové výroby 6-aminopenicilánové kyseliny z fenoxymethylpenicilinu stabilizovanými buňkami kvasinek podle předmětného vynálezu je vyznačen tím, že se enzymová hydrolýza provádí suspenzí kvasinek obsahujících enzym V-penicilinamidázu, zejména suspenzí buněk kvasinky *Cryptococcus* sp. CCY 17-22-1, předem chemicky stabilizovaných působením bifunkčního činidla, jako jsou dialdehydy dikarboxylových kyselin, s výhodou působením glutaraldehydu, a předem vypraných roztoky anorganických solí silných kyselin a/nebo zásad, s výhodou síranem amonným, a s použitím roztoku fenoxymethylpenicilinu v koncentraci 1,0 až 10 % hmota/objem, s výhodou 4 až 7 % hmota/objem, při pH 7,0 až 8,5, s výhodou 8,0 při teplotě 10 až 45 °C, s výhodou 37 °C v míchaném reaktoru, a po ukončené hydrolýze a ochlazení reakční směsi na teplotu 0 až 5 °C se suspenze stabilizovaných a vypraných kvasinek oddělí a použije k hydrolýze čerstvé násoady roztoku fenoxymethylpenicilinu a ze supernatantu, popřípadě z matečného louhu se po úpravě pH a teploty izoluje 6-aminopenicilánová kyselina, popřípadě regeneruje fenoxyoctová kyselina, přičemž se enzymová hydrolýza fenoxymethylpenicilinu a izolace 6-aminopenicilánové kyseliny, popřípadě regenerace fenoxyoctové kyseliny, alespoň dvakrát opakuje.

Ke způsobu výroby podle předmětného vynálezu lze použít roztok fenoxymethylpenicilinu ve formě kyseliny, získaného při zpracování vyfermentované živné půdy po ukončené kultivaci, nebo meziproduktů získaných z různých fází izolace a čištění fenoxymethylpenicilinu.

Stabilizace vodné suspenze kvasinek a jejich praní podle předmětného vynálezu se provádí za míchání při teplotách 10 až 40 °C v rozmezí koncentrací glutaraldehydu 0,5 až 10 % objem/objem, výhodně 2 % objem/objem, při koncentraci buněk 1 až 15 % hmota/objem sušiny, s výhodou 10 % hmota/objem sušiny buněk po dobu 0,5 až 5 hodin, výhodně 3 hodiny, načež se suspenze stabilizovaných kvasinek zředí vodou, buňky se oddělí, znovu suspendují ve vodě a za míchání ošetří vnášením pevného síranu amonného v rozmezí jeho koncentrací ve vodné suspenzi 0,1 až 5,0 mol . liter^{-1} , výhodně 2,0 mol . liter^{-1} , po dobu 1 až 10 ho-

259996

din, výhodně 2 hodiny, suspenze se zředí vodou, kvasinky se oddělí a alespoň dvakrát promyjí vodou.

Ke způsobu výroby podle předmětného vynálezu lze kromě technických forem fenoxymethylpenicilinu použít i roztoky čistého fenoxymethylpenicilinu ve formě amonné, draselné nebo sodné soli.

Přechovávání, skladování a transport stabilizovaných vypraných a promytých kvasinek před jejich použitím se podle předmětného vynálezu provádí tak, že se buď přechovává vodná suspenze buněk v chlazeném zásobníku při teplotách v rozmezí 1 až 30 °C, výhodně 5 až 15 °C, nebo se tato zahuštěná suspenze za míchání krátkodobě ošetří silně podchlazeným acetonem nebo ethanolem v poměru 1 objemový díl buněčné suspenze na 2 až 5 objemových dílů acetonu nebo ethanolu, načež se buňky separují odstředěním nebo filtrací, vlhký koláč stabilizovaných buněk se homogenizuje a usuší při teplotě 10 až 45 °C, s výhodou 30 °C, suchá hmota stabilizovaných buněk se mechanicky homogenizuje a před použitím přechovává v dobře uzavřených obalech při teplotách 1 až 45 °C, s výhodou 15 až 20 °C.

Uvedené řešení technologie enzymové výroby 6-aminopenicilánové kyseliny z fenoxymethylpenicilinu stabilizovanými buňkami kvasinek má, oproti známému a dosud využívanému postupu enzymové výroby této kyseliny z benzylpenicilinu pomocí stabilizovaných bakterií, popsané v čs. autorském osvědčení č. 201 621, tyto výhody:

- a) vychází z podstatně stabilnější suroviny přírodního antibiotika,
- b) umožňuje zvýšit kvalitu 6-APK,
- c) umožňuje zvýšit výtěžnost 6-APK,
- d) umožňuje dlouhodobé uchovávání, skladování a transport stabilizovaných buněk v suché formě,
- e) odstraňuje nebezpečí napadení kultur bakteriofágem,
- f) umožňuje zkrátit časové prodlevy mezi jednotlivými cykly semikontinuálním způsobem, neboť kvasinky mají lepší sedimentační vlastnosti než bakterie,
- g) snižuje nepříjemné společenské, pracovní a sociální problémy spojené s výrobou 6-APK,
- h) umožňuje flexibilní přechod na alternativní možnosti enzymových technologií pro výrobu polosyntetických antibiotik 3-laktamové řady.

Určitou nevýhodou předmětné technologie ve srovnání s postupem výroby 6-APK z benzylpenicilinu, podle čs. autorského osvědčení č. 201 621, je fáze výroby enzymově aktivní biomasy kvasinek,

259996

podle čs. autorského osvědčení č. 250 495, což se projevuje nižší růstovou rychlostí kvasinek ve srovnání s bakteriemi, z čehož rezultuje více jak dvojnásobná kultivační doba, čímž se v provozních podmínkách zvyšuje riziko sekundární kontaminace. Další nevýhodou je v čs. podmínkách dostupnost fenylpropionové kyseliny, která slouží v určité fázi růstu kvasinek produkčního kmeny jako jediný zdroj uhlíku a energie.

Suchý biokatalyzátor stabilizovaných kvasinek je tvořen béžovým až hnědým amorfním práškem, obsahujícím individuální suché buňky kvasinek a arteficiální "agregáty" vzniklé sušením a nedokonalou homogenizací ve formě nepravidelných hrudek. Obsah sušiny se pohybuje v rozmezí 80 až 95 %. Během několikanásobného opakovaného použití se hrudky a arteficiální agregáty rozpadnou na individuální buňky. Sedimentační rychlost materiálu po jeho nabobtnání ve vodě se významně neliší od buněk intaktních. Hrubší frakce, která činí v průběhu asi 20 % suché hmoty, po nabobtnání velmi rychle sedimentuje. Ke kvantitativní sedimentaci 10 % suspenze nabobtnalého biokatalyzátoru stabilizovaných buněk vede odstředění při relativní odstředivé síle 5000 g za 10 až 15 minut. Suchý biokatalyzátor na bázi stabilizovaných buněk kvasinek lze za sucha prosívat. Po nabobtnání ve vodě (24 hodin) nelze filtrovat, pouze odstřeďovat. Dobře nabobtnalý biokatalyzátor po odstředění zaujímá více jak dvojnásobný objem ve srovnání s jeho suchou formou. Specifická enzymová aktivita biokatalyzátoru se pohybuje od 60 do 140 U . g⁻¹ suché hmoty. Biokatalyzátor je v suchém stavu stabilní, tj. jeho specifická enzymová aktivita se nemění minimálně po dobu 1 roku, je-li uchováván v dobře uzavřených obalech, například zataven v polyethylenových sáčkách, při teplotách v rozmezí 1 až 20 °C.

Jedna jednotka (U) enzymové aktivity V-penicilinamidázy je takové množství enzymu, které katalyzuje vznik jednoho μ molu 6-APK z roztoku K-soli V-penicilinu za jednu minutu, při teplotě 37 °C a pH 8,0 v prostředí 0,05 M fosfátového pufru v oblasti enzymové reakční kinetiky nultého řádu. Rozměr aktivity: μ mol 6-APK . min⁻¹ . ml⁻¹. Specifická aktivita je vyjádřena jako U . g⁻¹ suché hmoty buněk.

Ke stanovení enzymové aktivity V-penicilinamidázy bylo použito spektrofotometrické stanovení 6-APK její reakcí s p-dimethylaminobenzaldehydem podle čs. patentového spisu č. 116 959.

Stupeň teoretické konverze substrátu na produkt byl sledován jednak spektrofotometricky, jednak vysokotlakou kapalinovou chromatografií (HPLC). Podmínky měření: kolona Separon SGX NH₂, 7 µm, 4 x 250 mm, mobilní fáze: CH₃CN : H₂O (0,006 M NaH₂PO₄ · 2 H₂O) = 40 : 60. Objemový průtok 1 ml · min⁻¹, teplota 25 °C, tlak 72 bar, detekce při 215 nm, A.U.F.S. = 0,02. Objem nástřikové smyčky 10 µl. Standardy i reálné vzorky byly rozpuštěny v mobilní fázi. Metody HPLC bylo rovněž použito k hodnocení čistoty a obsahu účinné látky v produktu (6-APK) po izolaci, dále k měření koncentrací druhého produktu, fenoxyoctové kyseliny a substrátu, V-penicilinu.

Kritériem použitelnosti stabilizovaných buněk není jejich specifická aktivita, ale účinnost a kvantitativní stupeň konverze V-penicilinu na 6-APK za časovou jednotku. Doporučená analytická norma použitelnosti vlhkého nebo suchého biokatalyzátoru pro přípravu 6-APK z V-penicilinu je následující: dosažení kvantitativní konverze K-soli V-penicilinu při jeho počáteční koncentraci min. 6,0 % hmota/objem a koncentraci biokatalyzátoru min. 70 g sušiny . . liter^{-1} za 120 minut za podmínek teplota 37 °C, pH kontinuálně udržováno zředěnou čpavkovou vodou (1 : 1) v rozmezí hodnot 7,9 až 8,0, nepřetržité míchání reakční směsi.

Způsob enzymové výroby 6-aminopenicilánové kyseliny z fe-
noxymethylpenicilinu stabilizovanými buňkami kvasinek je dále do-
ložěn v příkladech provedení včetně surovinového a strojnětechno-
logického řešení výroby.

Příklady provedení

Příklad 1

Suroviny pro výrobu stabilizovaných kvasinek

Nepromytá buněčná pasta (15 až 20 % sušiny) nebo zahuštěná vodná buněčná suspenze kvasinek (80 až 100 g sušiny . lit^{-1}).

Glutaraldehyd (25 % vodný roztok).

Síran amonný (čistý).

Aceton (čistý).

Suchý led.

Hydroxid draselný (čistý).

Pitná voda.

Destilovaná voda.

Specifikace strojního zařízení pro výrobu stabilizovaných kvasinek

1. Reakční tlakový kotel 500 litrů, 1 ks, AKV, opatřený míchadlem s měnitelnou frekvencí míchání 100 až 1000 otáček . min⁻¹. Kotel opatřený zařízením na měření objemu.
2. Směšovací tlakový kotel 2 m³, 1 ks, opatřený míchadlem, frekvence míchání 200 otáček . min⁻¹.
3. Sedimentační odstředivka, 1 ks, s parciálním odstředěním.
4. Rozmíchací kotel na aceton 500 litrů, 1 ks, AKV, duplikátor, chlazení solankou, rychloběžné vrtulové míchadlo 500 až 1000 otáček . min⁻¹, kotel opatřený zařízením na měření objemu. Nevýbušné provedení.
5. Separační resp. filtrační zařízení, 1 ks, možno použít 4 alternativní zařízení.
 - 5/1. Vakuová nuč, 1 ks, s hustě perforovaným sítem, AKV nebo z plastické hmoty s vloženým textilním materiálem - kalolisová plachetka, vysoké vakuum.
 - 5/2. Kalolis, 1 ks, opatřený buď aspestocelulózovými deskami nebo kalolisovou plachetkou.
 - 5/3. Rotační vakuový filtr, 1 ks, buben potažený kalolisovou plachetkou, vysoké vakuum.
 - 5.4. Filtrační odstředivka, 1 ks, AKV, buben potažený kalolisovou plachetkou, nevýbušné provedení.
6. Tácy z plastické hmoty, 100 ks, o rozměrech 50 x 100 cm, umístěné nad sebou v kovových konstrukcích, které jsou transportovatelné pomocí vysoko zdvižného hydraulického vozíku.
7. Jemná mlynářská síta, 20 ks.
8. Fluidní sušárna, 1 ks, nevýbušné provedení.
9. Kulový mlýn, 1 ks.

Postup výroby stabilizovaných kvasinek

Zahuštěná buněčná suspenze intaktních kvasinek v množství 100 litrů, která byla získána submersní kultivací a separací postupem podle čs. autorského osvědčení č. 250 495, se přecherpa do kotle 1. Suspenze obsahuje 70 až 100 g sušiny buněk . liter⁻¹. Vodná suspenze buněk se v zařízení 1 dokonale homogenizuje zvýšenou frekvencí míchání. V průběhu intenzivního míchání se ke 100 litrům zahuštěné suspenze postupně přidává 8 litrů 25 % vodného roztoku glutaraldehydu. Aktuální koncentrace glutaraldehydu 259996

v reakční směsi je 2 % objem/objem. Suspenze se ponechá asi 15 minut intenzívně míchat, poté se změří pH a upraví 40 % (hmota/objem) vodným roztokem KOH v rozmezí hodnot 7,5 až 7,8. Po úpravě pH se sníží intenzita míchání na 250 až 300 otáček $\cdot \text{min}^{-1}$ a touto intenzitou se nepřetržitě míchá po dobu 3 hodin. Poté se změří pH, suspenze se maximálně zředí vodou a čerpá do směšovacího kotle 2. Zde se opět maximálně zředí vodou, asi 30 minut se v tomto zařízení zředěná suspenze míchá a poté se čerpá na odstředivku 3. Suspenze se zahustí na objem 100 litrů o sušině 70 až 100 g $\cdot \text{litr}^{-1}$. Supernatant při odstřeďování je mírně opalescentní, nesmí však obsahovat individuální buňky kvasinek (seřízení odstředivky). Sediment z odstředivky 3 se čerpá zpět do kotle 1.

Ke 100 litrům vodné suspenze stabilizovaných kvasinek, která je předložena v kotli 1, se za míchání postupně vnáší pevný síran amonný v celkovém množství 20,5 kg. Aktuální koncentrace síranu amonného v suspenzi je 265 g $\cdot \text{litr}^{-1}$, tj. 2,0 mol $\cdot \text{litr}^{-1}$. Suspenze se asi 1 hodinu intenzívně míchá, poté se míchání zpomalí asi na 200 až 300 otáček $\cdot \text{min}^{-1}$ a při této intenzitě míchá po dobu 2 hodin. Po této době se míchaná suspenze maximálně zředí vodou a přečerpá do směšovacího kotle 2. Zde se opět co nejvíce zředí vodou, míchá asi 30 minut a poté se čerpá na odstředivku 3. Sediment se zahustí na původní objem 100 litrů. Supernatant při odstřeďování je kalný a opalescentní, nesmí však obsahovat individuální kvasinky (seřízení odstředivky). Zředění sedimentu vodou a další odstředění je v případě velmi kalného supernatantu nutno opakovat.

Ve fázi praní stabilizovaných buněk dochází k větším ztrátám hmoty buněk. Získá se asi 75 až 80 % sušiny stabilizovaných, vypraných a promytých buněk, vztaženo na množství sušiny ve výchozí suspenzi intaktních kvasinek. Stabilizované kvasinky lze přečerpáním do zásobních chlazených kotlíků na sediment skladovat, eventuálně použít ve formě vodné suspenze k bezprostřední přípravě 6-APK z V-penicilinu. Druhou možností je buněčnou suspenzi ošetřit acetonem nebo ethanolem a buňky usušit a skladovat, respektive použít v suchém stavu stejným způsobem. Enzymová aktivita kvasinek je ve stabilizované vlhké i suché formě dostatečně stabilní. Pro transport a dlouhodobé skladování biokatalyzátoru je však výhodnější jeho suchá forma.

Případné zpracování suspenze stabilizovaných, vypraných a promytých buněk do suché formy se provede následujícím způsobem.

100 litrů ochlazené suspenze (5°C), obsahující 80 až 100 g sušiny $\cdot \text{litr}^{-1}$ stabilizovaných a vypraných kvasinek, se ze skladovacího kotlíku čerpá do rozmíchacího kotle 4, kde bylo předem předloženo 300 litrů silně podchlazeného acetonu. Aceton se v zařízení 4 popřípadě ještě více podchladí vnášením suchého ledu tak, aby jeho teplota se pohybovala alespoň kolem -10°C . Při čerpání suspenze buněk ze skladovacího kotlíku do kotle 4 se předložený aceton intenzívně míchá, 500 až 1000 otáček $\cdot \text{min}^{-1}$. Přečerpání suspenze do předloženého podchlazeného acetonu musí být rychlé, míchání při čerpání i po načerpání intenzívní. Stabilizované a vyprané buňky se dehydratují acetonem za intenzívního míchání při nízké teplotě maximálně po dobu 5 minut. Acetonová suspenze buněk se po uvedené době ihned vypouští na filtrační zařízení 5. Přebytečný aceton se rychle a ostře vakuově odsaje a vlhký koláč promyje malým množstvím podchlazeného acetonu a znovu odsaje. Aceton se regeneruje destilací. Dobře odsátá hmota se po částech rozloží na série táců umístěných v kovových konstrukcích nad sebou, zařízení 6, a hmota se na tácech rozprostře v tenké, asi 1 cm vrstvě. Materiál se poté suší po dobu 24 hodin při teplotě 20 až 30° v sušárně 8. Usušený materiál se přesítuje přes jemná mlynářská síta 7, a zbylý materiál ve formě amorfních zpečených hrudek se mechanicky homogenizuje na zařízení 9. Oba podíly se spojí, zváží a homogenizují. Suché stabilizované buňky kvasinek se uloží do dobře uzavřených polyethylenových lahví nebo se zataví do polyethylenových sáčků a po jejich analýze skladují při teplotě 10 až 15°C . Homogenát suchého materiálu, stejně tak jako vodná suspenze stabilizovaných kvasinek, se analyzuje na obsah sušiny, specifickou aktivitu V-penicilinamidázy a účinnost a stupeň konverze K-soli V-penicilinu postupy uvedenými v popisu předmětného vynálezu.

Z 1 kg sušiny intaktních kvasinek po fermentaci a separaci se získá přibližně 0,8 kg sušiny stabilizované, zahuštěné, vodné suspenze buněk, nebo přibližně 0,7 kg suchého biokatalyzátoru stabilizovaných buněk o specifické aktivitě v rozmezí 60 až 140 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$. Obsah sušiny suchého biokatalyzátoru je obvykle vyšší než 90 %. Fyzikální vlastnosti tohoto suchého materiálu jsou uvedeny v popisu předmětného vynálezu.

Příklad 2

Suroviny pro výrobu 6-APK z V-penicilinu pomocí stabilizovaných kvasinek

Biokatalyzátor (zahuštěná vodná suspenze, nebo suchá forma stabilizovaných buněk), jehož postup přípravy byl uveden v příkladu 1. K-sůl V-penicilinu (min. 1500 mj/mg).

Čpavková voda (čistá).

Kyselina sírová (čistá).

Hydroxid sodný (čistý).

Sedipur CL 930, BASF, Ludwigshafen, NSR

Butylacetát nebo ethylacetát (čistý), možno použít i regenerovaný destilací.

Aceton (čistý), možno použít i regenerovaný destilací.

Ethylalkohol (čistý), možno použít i regenerovaný destilací.

Síran amonný (čistý).

Demineralizovaná voda.

Destilovaná voda.

Specifikace strojního zařízení pro výrobu 6-APK z V-penicilinu pomocí stabilizovaných kvasinek

1. Skladovací nádrž na buněčnou suspenzi, 5 m³, 2 ks, duplikátor, chlazení solankou, míchání, 200 otáček . min⁻¹, 2 šestilopatková míchadla na společné ose.
2. Dávkovací čerpadlo, 1 ks, výkon průměrně 800 litrů suspenze . h⁻¹.
3. Sedimentační odstředivka, 1 ks, s parciálním odstředěním.
4. Kotlík na buněčný sediment, 250 litrů, 4 ks, duplikátor, chlazení solankou, míchání.
5. Zásobník na buněčný sediment, 500 litrů, 4 ks, duplikátor, chlazení solankou, míchání.
6. Tlakový reaktor na štěpení, 3 m³, 1 ks, duplikátor, chlazení vodou, topení, termoregulace, míchání 180 až 250 otáček . min⁻¹, 2 šestilopatková míchadla umístěná na společné ose, vestavěná pH elektroda s kompenzací na hydrostatický tlak kapaliny, zpřežená s regulačním zařízením na kontinuální úpravu pH a dávkovacím zařízením na čpavkovou vodu.
7. Zásobník na ředěnou čpavkovou vodu, 400 litrů, 1 ks, míchadlo.

8. Deskový chladič, 2 ks, solanka asi $150.000 \text{ kcal} \cdot \text{h}^{-1}$; $t_1 = 38^\circ\text{C}$, $t_2 = 5^\circ\text{C}$.
9. Tlakový krystalizační kotel, 3500 litrů, 4 ks, smalt, duplikátor, chlazení solankou, míchadlo.
10. Odměrka a ředící kotel na kyselinu sírovou, 200 litrů, 1 ks, smalt, duplikátor, chlazení vodou, míchadlo.
11. Tlakový filtr, 1 ks, filtr Variox s filtračními přehrádkami $40 \times 40 \text{ cm}$ z asbestocelulózy, přepážky C 10.
12. Filtrační odstředivka, 2 ks, nevýbušné provedení, průměr 0,9 m.
13. Suspendační kotlík na mokrý produkt, 600 litrů, 1 ks, AKV, nevýbušné provedení, duplikátor, chlazení solankou, vrtulové rychloběžné míchadlo.
14. Vakuová sušárna, 5 ks, nevýbušné provedení, 4 kPa, 60 kg náplně.
15. Zásobník na matečné louhy, 2500 litrů, 2 ks, nevýbušné provedení, duplikátor, chlazení vodou, míchadlo, průhledítko.
16. Extrakční kotel, 1 m^3 , 2 ks, AKV, nevýbušné provedení, duplikátor, chlazení solankou, průhledítko pro oddělení dvou kapalných fází, míchadlo.
17. Ultrafiltrační jednotka UVF-400, 1 ks, výkon $1 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$, ultrafiltrační membrány CP-20.

Popis výroby 6-APK z V-penicilinu stabilizovanými kvasinkami

Biokatalyzátor ve vlhké formě vodné suspenze, nebo suchý biokatalyzátor předem nabobtnalý ve vodě po dobu 24 hodin, jehož způsob přípravy byl uveden v příkladu 1, je uchováván v zásobnících 5, kde je chlazen na teplotu 5 až 15°C . Koncentrace suspenze je definována sušinou.

Do reaktoru 6 se načerpá 1500 litrů demineralizované vody a takové množství suspenze ze zásobníku 5, aby vznikl výsledný objem homogenní suspenze 1920 litrů, obsahující 6 až 7 % sušiny kvasinek $\cdot \text{liter}^{-1}$. Suspenze se za míchání vytemperuje na teplotu 37°C a pH se upraví zředěnou čpavkovou vodou (1:1) na pH v rozmezí hodnot 7,9 až 8,0 ze zásobníku 7. Množství sušiny stabilizované biomasy se volí podle konverzního testu, který byl uveden v popisu předmětného vynálezu. Do reaktoru se v průběhu míchání postupně vsype 130 kg draselné sole V-penicilinu. Enzymová hydrolyza trvá maximálně 2 hodiny. Průběžně se kontroluje spotřeba čpavkové vody a analyticky přírůstky koncentrací 6-APK. Skončení

259996

hydrolýzy je indikováno zastavením spotřeby roztoku alkálie a analyticky. Po skončení hydrolýzy je obsah reaktoru ihned co nejrychleji vypouštěn do skladovací nádrže 1. Suspenze natékající do nádrže 1 je míchána a chlazena a ihned čerpána na deskový chladič 8, kde je chlazena solankou na teplotu 5 °C. Z chladiče se vrací zpět do nádrže 1. Odtud, po vychlazení se ihned čerpá na sedimentační odstředivku 3.

Odstředivka 3 je zapojena a předem vyzkoušena a včas nastartována na vodu. Průtok kapaliny je nastaven na 800 litrů . h⁻¹. Parciální odstřel odstředivky v objemu 5 až 10 litrů v intervalech 5 až 8 minut. Po přepnutí odstředivky na vychlazenou suspenzi jsou uvedené parametry řízeny tak, aby průtok byl pokud možno maximální při nejvyšší hodnotě sedimentu a filtrátu mírně opalescentního, avšak bez buněk (mikroskopická kontrola). Supernatant je veden do krystalizačního kotle 9. Hustý sediment buněk s částí reakční směsi je shromažďován v chlazených kotlících 4.

V jedné z krystalizačních nádrží 9 se supernatant za míchání chladí. Po načerpání veškerého supernatantu do krystalizační nádrže 9 se provede čeření supernatantu postupem podle čs. autorského osvědčení č. 218 182 takto:

pH roztoku se za míchání upraví 40 % objem/objem roztokem kyseliny sírové na hodnotu 6,4 až 6,8 z odměrky 10 a poté se za míchání k supernatantu z přenosné nádoby z plastické hmoty přidá 10 litrů zředěného roztoku Sedipuru CL 930, připraveného podle dále uvedeného postupu. Kapalina se asi 10 minut míchá a poté se ponechá v klidu. Soustava se ponechá asi 15 minut v klidu flokulovat. Po uplynutí této doby se vyflokulovaná chlazená soustava tlakem 0,15 až 0,20 MPa dávkuje na tlakový filtr 11. Čirý, jiskrný filtrát se zachytává do další krystalizační chlazené nádrže 9. Po skončení filtrace se celé zařízení profouká tlakovým vzduchem a propláchne asi 50 litry demineralizované vody. Zásobní roztok Sedipuru CL 930 se připraví takto: ve 4,5 litrech destilované vody se rozpustí 0,5 kg Sedipuru a za míchání se dokonale rozpustí. Z tohoto zásobního roztoku se připraví tzv. pracovní roztok Sedipuru. Do nádoby z plastické hmoty, v které bylo předem předloženo 10 litrů destilované vody, se nalije 250 až 400 ml zásobního roztoku Sedipuru. Tento pracovní roztok se promíchá a použije k čeření supernatantní kapaliny podle následujících kritérií. Při nepatrně zakaleném supernatantu se použije k přípravě pracovního roztoku 250 ml (transmitance supernatantu

80 %), při vyšším stupni zákalu se použije 350 až 400 ml zásobního roztoku Sedipuru do 10 litrů vody (transmitance supernatantu 60 % a menší). Zákal supernatantu se měří při 600 nm. Zásobní roztok Sedipuru (0,5 kg/4,5 litru) nesmí být starší než 1 týden.

K asi 1700 až 1800 litrům vyčeřeného, vychlazeného supernatantu po filtraci, předloženého v krystalizačním kotli 9, se za míchání přidá 500 litrů destilovaného butylacetátu a průběžně se za okyselování 40 % roztokem objem/objem kyseliny sírové z odměrky 10, upraví pH na 4,3. Po konečné úpravě pH se suspenze ponechá asi 1 hodinu míchat a poté se ponechá 1 až 2 hodiny v klidu krystalizovat za chlazení. Poté se zapne míchadlo a produkt se vede na filtrační odstředivku 12. Matečné louhy se vedou do zásobníku 15. Vlhký produkt na filtrační odstředivce 12 se prokryje asi 10 litry studené destilované vody a suspenduje pomocí rychloběžného míchadla v 60 litrech vychlazené směsi aceton/ethanol (3:1), předložené v suspenčním kotlíku 13. Suspenze se vede opět na filtrační odstředivku 12, kde se prokryje asi 5 litry ledového acetonu. Všechny promývací roztoky musí být předem vychlazené na 5 °C. Promytý vlhký produkt se ukládá na tácy překryté polyethylenovými fóliemi a suší se v zařízení 14 po dobu 24 hodin. Po usušení se suchý produkt zhomogenizuje a zváží.

Matečné louhy s prokrývkami organických rozpouštědel se shromažďují v zásobníku 15. Analyticky se určí obsah 6-APK ve vodné fázi. Koncentrace 6-APK v matečných louzích se pohybuje v rozmezí 2000 až 3000 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Vodná fáze matečných louhů se gravitačně oddělí přes průhledítko a vede se k likvidaci. Organická fáze se přetlačí do extrakčního kotle 16, a za míchání se přidá kolem 300 litrů demineralizované vody a upraví se pH 40 % hmota/objem roztokem NaOH v rozmezí hodnot 7,8 až 8,0. Po asi 30 minutách míchání se v klidu obě fáze gravitačně oddělí, vodná fáze se přetlačí do zásobníku 15, a organická fáze se vede k regeneraci destilací. Vodná fáze se přetlačí ze zásobníku 15 zpět do extrakčního kotle 16 a regeneruje se z ní fenoxyoctová kyselina takto: míchaná vodná fáze se okyselí na pH 2,0 40 % hmota/objem roztokem kyseliny sírové a intenzivně se chladí (5 °C). Poté se míchadlo zastaví a fenoxyoctová kyselina se ponechá v klidu krystalizovat 2 až 3 hodiny. Poté se vlhký produkt za míchání vede na filtrační odstředivku 12, odstředěný druhý produkt se promyje asi 25 litry studené demineralizované vody a suší na tácech odděleně v zařízení 14. Takto se regeneruje asi 85 % fenoxyoctové ky-

259996

seliny. Matečné louhy se vedou k likvidaci.

Použitý biokatalyzátor ve formě zahuštěné chlazené suspenze stabilizovaných kvasinek obsahující část reakční směsi z předcházejícího cyklu, se čerpá zpět do reaktoru 6, kde je předloženo 1500 litrů demineralizované vody. Po načerpání suspenze použitého biokatalyzátoru se zkontroluje obsah sušiny, objem v reaktoru se nastaví opět na 1920 litrů přídavkem demineralizované vody, suspenze se za míchání vytemperuje na 37 °C a zahájí se další cyklus enzymové hydrolýzy V-penicilinu popsáním způsobem. Časová prodleva mezi jednotlivými cykly nemá být delší než 4 hodiny. Při delším skladování použitého biokatalyzátoru s částí reakční směsi z předcházejícího cyklu se začíná nepříznivě projevovat vzrůst degračních produktů 6-APK.

S cílem zvýšení kvality 6-APK lze popřípadě zařadit ještě další čištění supernatantu po konverzi a čerání před izolací pomocí ultrafiltrace takto: čirý, jiskrný, vychlazený supernatant po filtraci na zařízení 11, se z krystalizačního kotle 9 tlakem dávkuje na ultrafiltrační jednotku 17. Supernatant v průběhu ultrafiltrace recirkuluje přes druhý deskový chladič 8 tak, aby jeho teplota nevystoupila nad 5 °C. Získaný permeát se čerpá do dalšího krystalizačního kotle 9, kde se chladí a míchá. Získá se asi 1600 litrů permeátu a asi 200 litrů koncentráту. Krystalizace produktu z permeátu se provádí odděleně v přítomnosti organických rozpouštědel popsáním způsobem. Koncentrát po ultrafiltraci se zpracovává odděleně takto: chlazený koncentrát se za intenzivního míchání upraví 40 % roztokem kyseliny sírové na hodnotu 2,0 až 2,1. Po úpravě pH se za míchání přidá takové množství pevného síranu amonného, aby vznikl roztok s jeho 60 % saturací. pH během přidávání pevného síranu amonného udržovat v rozmezí uvedených hodnot. Po vnesení veškerého síranu amonného se roztok míchá asi 30 minut a poté se ponechá 30 minut v klidu. Roztok se vakuově přefiltruje na nuči s vloženou kalolisovou plachetkou přes vrstvu křemeliny. Přefiltrovaný roztok se převede do chlazené a míchané nádoby a za míchání se nastaví pH zředěným roztokem NaOH na 4,3. Po jeho krystalizaci se produkt zpracovává popsáním způsobem s tím rozdílem, že se získaný vlhký produkt na filtrační odstředivce prokryje studenou destilovanou vodou, suspenduje napřed ve vychlazeném butylacetátu a znovu na filtrační odstředivce separuje, prokryje destilovanou vodou a suspenduje ve směsi aceton/ethanol a znovu zfiltruje, prokryje ledovým acetonem a odděleně suší. Organická rozpouštědla po zpracování permeátu a kon-

259996

centrátu jsou regenerována, stejně tak jako fenoxyoctová kyselina popsáním způsobem.

Výtěžek 6-APK z 1. cyklu se pohybuje mezi 50 až 65 % teorie. Výtěžek 6-APK v 2. a následujících cyklech se pohybuje v rozmezí 82 až 85 % teorie. V matečných loužích se pohybuje koncentrace 6-APK v rozmezí 2,0 až 3,0 g 6-APK . liter^{-1} . Průměrná hodnota v matečných loužích je 2,5 g 6-APK . liter^{-1} , což je asi 10 %. Obsah účinné látky v suchém produktu se pohybuje v rozmezí 98 až 100 %. Manipulační ztráty biokatalyzátoru na bázi stabilizovaných kvasinek při jeho semikontinuálním cyklování činí maximálně 1 % ztrát hmoty sušiny/cyklus a jsou kompenzovány přidáváním zásobního nepoužitého biokatalyzátoru.

P R E D M Ě T V Ý N Ě A Ľ E Ž Ů

1. Způsob enzymové výroby 6-aminopenicilánové kyseliny z fenoxymethylpenicilinu stabilizovanými buňkami kvasinek, v y z n a -
č u j í c í s e t í m , že se enzymová hydrolýza provádí
suspenzí kvasinek, obsahujících enzym V-penicilin amidázu,
zejména suspenzí buněk kvasinky *Cryptococcus* sp. CCY 17-22-1,
předem chemicky stabilizovaných působením bifunkčního činidla,
jako jsou dialdehydy dikarboxylových kyselin, s výhodou působením
glutaraldehydu, a předem vypraných roztoky anorganických
solí silných kyselin a/nebo zásad s výhodou síranem amonným,
a s použitím roztoku fenoxymethylpenicilinu v koncentraci
1,0 až 10,0 % hmota/objem, s výhodou 4 až 7 % hmota/objem,
při pH 7,0 až 8,5, s výhodou 8,0, při teplotě 10 až 45 °C,
s výhodou 37 °C, v míchaném reaktoru a po ukončené hydrolýze
a ochlazení reakční směsi na teplotu 0 až 5 °C se suspenze
stabilizovaných a vypraných kvasinek oddělí a použije k hydro-
lýze čerstvé násady roztoku fenoxymethylpenicilinu a ze super-
natantu, popřípadě z matečného louhu se po úpravě pH a teplo-
ty izoluje 6-aminopenicilánová kyselina, popřípadě regeneru-
je fenoxyoctová kyselina, přičemž se enzymová hydrolýza fe-
noxymethylpenicilinu a izolace 6-aminopenicilánové kyseliny,
popřípadě regenerace fenoxyoctové kyseliny, alespoň dvakrát
opakuje.
2. Způsob podle bodu 1, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že se jako substrátu použije roztoku fenoxymethylpenicilinu
ve formě amonné, draselné nebo sodné soli.
3. Způsob podle bodu 1, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že se jako substrátu použije surového roztoku fenoxymethylpe-
nicilinu ve formě kyseliny, získaného při zpracování vyfermen-
tované živné půdy po ukončené kultivaci, nebo meziproductů
získaných z různých fází izolace a čištění fenoxymethylpeni-
cilinu.
4. Způsob podle bodu 1, v y z n a č u j í c í s e t í m ,
že stabilizace vodné suspenze kvasinek a jejich praní se pro-
vádí za míchání při teplotách 10 až 40 °C, v rozmezí koncentra-
cí glutaraldehydu 0,5 až 10 % objem/objem, s výhodou 2 % ob-
jem/objem, při koncentraci buněk 1 až 10 % hmota/objem sušiny,
s výhodou 5 až 8 % sušiny hmota/objem, po dobu 0,5 až 5 hodin,
s výhodou 3 hodiny, načež se suspenze stabilizovaných kvasinek

zředí vodou, buňky se oddělí, znovu suspendují ve vodě a za míchání ošetří vnášením pevného síranu amonného v rozmezí jeho koncentrací ve vodné suspenzi 0,1 až 5,0 mol . liter^{-1} , s výhodou 2,0 mol . liter^{-1} , po dobu 1 až 10 hodin, s výhodou 2 hodiny, suspenze se zředí vodou, kvasinky se oddělí a alespoň dvakrát promyjí vodou.

5. Způsob podle bodů 1 a 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že stabilizované, vyprané a promyté kvasinky se před výrobou 6-aminopenicilánové kyseliny přechovávají ve formě zahuštěné vodné suspenze v chlazeném zásobníku při teplotách v rozmezí 1 až 30 °C, s výhodou 5 až 15 °C, nebo se tato zahuštěná suspenze za míchání krátkodobě ošetří silně podchlazeným acetonem nebo ethanolem v poměru 1 objemový díl buněčné suspenze na 2 až 5 objemových dílů acetonu nebo ethanolu, načež se buňky separují odstředěním nebo filtrací, vlhký koláč stabilizovaných buněk se homogenizuje a usuší při teplotě 10 až 45 °C, s výhodou 20 až 30 °C, suchá hmota stabilizovaných buněk se mechanicky homogenizuje a před použitím přechovává v dobře uzavřených obalech při teplotách 1 až 40 °C, s výhodou 15 až 20 °C.