



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

209676

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³

C 12 P 37/00

/22/ Přihlášeno 12 04 79
/21/ /PV 2533-79/

(40) Zveřejněno 31 03 81

(45) Vydáno 15 07 82

(75)

Autor vynálezu

BÁRTA MIROSLAV dr., VOJTÍŠEK VLADIMÍR dr. CSc., ČULÍK KAREL dr.,
ZEMAN ROMAN dr., DENK REIMUND ing., PRAHA, BUČKO MICHAL ing. CSc.,
MIKLÁŠ EMIL ing. a JAKUBOVÁ ANTONIA ing., BANSKÁ BYSTRICA

(54) Způsob výroby 6-aminopenicilánové kyseliny

1

Vynález se týká způsobu výroby 6-aminopenicilánové kyseliny enzymovou hydrolyzou penicilinu, zejména benzylpenicilinu, vázanými buňkami produkčního mikroorganismu *Escherichia coli* s vysokým obsahem penicilinacylázy.

Dosud používané způsoby výroby 6-aminopenicilánové kyseliny enzymovou hydrolyzou penicilinu zahrnují použití rozpustné penicilinacylázy, nativních buněk s penicilinacyláзовou aktivitou, jednotlivých kovalentně zesítěných buněk nebo různým způsobem vázaných buněk s penicilinacyláзовou aktivitou a vázané penicilinacylázy.

Využití vázaných buněk nebo vázaného enzymu pro přípravu 6-aminopenicilánové kyseliny /dále jen 6-APK/ má proti využití nativních buněk nebo rozpustného enzymu především tu výhodu, že vázané materiály lze opakovaně nebo kontinuálně využívat. Vázané buňky pak oproti vázanému enzymu mají především ekonomickou výhodu v nižších nákladech na jejich přípravu. Při jejich využití pro uvedený účel odpadají především náklady na proces čištění a izolace enzymu.

Podle čs. autorského osvědčení č. 201621 lze pro výrobu 6-APK použít jednotlivě kovalentně zesítěných a permeabilizovaných buněk *Escherichia coli*. Nevýhodou tohoto postupu však je nutnost oddělit tyto buňky pro jejich malé rozměry a tím špatné sedimentační vlastnosti po skončení enzymové reakce na velkokapacitních odstředivkách, což klade poměrně vysoké nároky na technické vybavení provozu.

Uvedené nedostatky sice odpadají při použití buněk vázaných na syntetické poly-

2

merní nosiče podle čs. autorského osvědčení č. 200802, avšak vedle vysoké ceny nosičů je jejich použití omezeno relativně nízkou specifickou aktivitou vázaných preparátů, která je způsobena tím, že buňky jsou vázány pouze na povrchu nosiče. Některé nevýhody tohoto postupu odpadají při využití vázaných buněk, jejichž příprava je popsána v čs. autorském osvědčení č. 197101.

Nedostatkem takto připravených vázaných buněk však je jejich relativně nízká specifická aktivita a špatné hydrodynamické vlastnosti, které brání jejich použití v reaktorech s pevným ložem biokatalyzátoru. USA patentový spis č. 4 113 566 popisuje využití vázaných buněk připravených zesítěním jednotlivých buněk *Proteus rettgeri* bifunkčním aldehydem a jejich následným zapolymerováním do organické matrice, v průtokovém reaktoru s mělkým ložem, přibližně asi do 6 cm, jímž recirkuluje roztok penicilinu. Nedostatkem tohoto postupu však je nutnost rozložení biokatalyzátoru na velkou plochu.

Zjistili jsme nyní, že mechanické a hydrodynamické vlastnosti vázaných buněk s vysokým obsahem penicilinacylázy, připravených podle čs. autorského osvědčení č. 203607, umožňují enzymové štěpení penicilinu v provozním měřítku, a to v míchaném vsádkovém reaktoru, recirkulačním reaktoru s pevným ložem a v kontinuálním průtokovém reaktoru sestávajícím z jednoho sloupce s pevným ložem s výhodou pak ze série sloupců s pevným ložem tohoto materiálu zapojených v kaskádě /sérii/.

Postupem podle vynálezu lze hydrolyzovat

roztok penicilinu částicemi suspendovaných vázaných buněk v míchaném reaktoru. Vzhledem k tomu, že při míchání standardními míchadly turbínového typu může docházet ke zmenšování velikosti částic, je výhodné použít míchadel, která umožňují dosažení krátkých míchacích časů při relativně malém smykovém namáhání kapaliny a suspendovaných částic.

Tomuto požadavku vyhovují např. kotvová míchadla a šroubové míchadlo. Při aktivitě vázaných buněk 6 až 9 j/mg a jejich koncentraci 10 až 150 mg/ml lze provádět štěpení roztoků penicilinu o koncentraci 0,025 mol/l až 0,4 mol/l, s výhodou 0,13 až 0,25 mol/l. Při koncentracích vyšších dochází k vysokému stupni inhibice enzymové aktivity a k neúměrnému prodloužení reakční doby, při koncentracích nižších pak stoupají nároky na izolaci produktu. Teplota, při níž lze reakci provádět, leží mezi 20 až 50 °C, s výhodou mezi 35 až 40 °C.

Při vyšších teplotách dochází k degradaci penicilinu i 6-APK, při teplotách nižších výrazně klesá rychlost hydrolýzy. Hodnota pH v průběhu reakce je udržována v rozmezí hodnot 7 až 8, s výhodou 7,5 až 8,0, dávkováním alkálie, jako např. žpavkové vody, roztoku hydroxidu sodného nebo draselného či organickými aminy. Při vyšších hodnotách pH dochází k hromadění degradačních produktů penicilinu a 6-APK, při hodnotách nižších pak klesá rychlost reakce.

Přítok roztoku alkálie je vhodné umístit v oblasti reaktoru, v níž dochází k intenzivnímu míchání, např. v blízkosti míchadla, čímž je zabráněno lokálnímu zvýšení pH a degradaci penicilinu a 6-APK. Za uvedených podmínek je reakce ukončena v rozmezí 1 až 4 hodin a ztráty produktu v důsledku spontánní degradace nepřevyšují 5 %. Po skončení reakce jsou vázané buňky buď odděleny filtrací nebo mohou být ve vhodné upraveném reaktoru dekantovány či promyty /vestavěné síto/ a opakovaně použity pro přípravu 6-APK.

Postupem podle vynálezu lze dále provádět hydrolýzu roztoku penicilinu recirkulací vrstvou vázaných buněk a úpravou pH v míchané nádrži, z níž je reakční směs čerpána na sloupec a kam je po průtoku sloupcem s pevným ložem biokatalyzátoru opět prováděna. V tomto případě lze hydrolýzu provádět buď ve vodném prostředí nebo s výhodou ve vhodném pufru. Teplotu při hydrolýze je podobně jako při hydrolýze v míchaném reaktoru vhodné udržovat mezi 20 až 50 °C, s výhodou mezi 35 až 40 °C.

Hodnota pH, na níž je udržován roztok penicilinu, resp. reakční směs, se pohybuje mezi 7,5 až 8,5 s výhodou mezi 7,7 až 8,2. Účinnost recirkulačního reaktoru s pevným ložem vázaných buněk závisí na rozdílu mezi hodnotou pH, na níž je upravován roztok penicilinu, a hodnotou na výtoku ze sloupce. Tato hodnota závisí jednak na výšce náplně katalyzátoru a na průtokové rychlosti kapaliny sloupcem, jednak na kvalitě a koncentraci pufrujících substancí. Sloupec lze plnit samotnými vázanými buňkami nebo jejich směsí s pomocnými filtračními látkami jako např. křemelinou. Optimální výška náplně se pohybuje mezi 7 až 30 cm při průtokové rychlosti v rozmezí 5 až 30 cm/min.

Za těchto podmínek je rychlost reakce minimálně ovlivňována difúzí a v případě, kdy gradient pH na sloupci vázaných buněk je minimální, resp. hodnota pH na výtoku ze sloupce s pevným ložem biokatalyzátoru neklesá pod hodnotu 7,0, lze dosáhnout stejného využití aktivity vázaných buněk jako v případě využití míchaného reaktoru. Výhodou tohoto postupu je, že vázané buňky jsou trvale umístěny ve sloupci a odpadí

jakákoliv manipulace s nimi mezi jednotlivými cykly opakovaného použití.

Další postup podle vynálezu, který lze použít k přípravě 6-APK, je kontinuální hydrolýza penicilinu při průtoku jeho roztoku o koncentraci 0,025 až 0,4 mol/litr sloupcem nebo s výhodou systémem sloupců s pevným ložem vázaných buněk s penicilincylázovou aktivitou. Využití aktivity enzymu v kontinuálním reaktoru s pevným ložem je závislé na pracovním pH, které klesá při průtoku roztoku penicilinu sloupcem s rostoucí konverzí.

Z tohoto důvodu je účinnost reaktoru závislá jednak na koncentraci penicilinu, jednak na koncentraci pufrujících substancí. Při vyšších koncentracích penicilinu je proto výhodné rozdělit náplň reaktoru do série 2 či více sloupců, přičemž před vstupem roztoku reakční směsi do každého následujícího sloupce je jeho pH upravováno dávkováním alkálie na původní hodnotu.

Zvláště výhodné je rozdělení materiálu vázaných buněk do sloupců o stejném průměru tak, aby po průtoku každým ze sloupců došlo k hydrolýze stejného dílu substrátu. Takovým způsobem pracující kontinuální enzymový reaktor zajišťuje vysoký stupeň využití penicilincylázové aktivity při nízkých nárocích na koncentraci pufrujících substancí.

Pro danou koncentraci penicilinu a zvolený počet sloupců lze výšku náplně v jednotlivých sloupcích vypočítat z integrované formy rychlostní rovnice pro hydrolýzu benzylpenicilinu katalyzovanou penicilincylázou /Warburton D., Dunnill P., Lilly M. D., Biotechnol. Bioeng., 15, 13, 1973/, která má následující tvar:

$$\frac{E \cdot h}{V \cdot P} = S_0 X - K_m \ln \frac{1}{1-X} - \frac{X}{K_f} + \frac{S_0}{K_f} + \frac{S_0^2}{K_a K_f} + \frac{S_0^2 X}{2 K_a} + \frac{1}{K_s} - \frac{X}{2 K_s} - K_m S_0 X \left(\frac{1}{K_a} + \frac{1}{K_f} + \frac{S_0}{K_a K_f} + \frac{S_0 X}{2 K_a K_f} \right),$$

kde jednotlivé symboly mají následující význam:

S_0 počáteční koncentrace benzylpenicilinu
 K_m Michaelisova konstanta
 X stupeň konverze
 K_f inhibiční konstanta pro kyselinu fenyl-octovou
 K_a inhibiční konstanta pro 6-APK
 K_s substrátová inhibiční konstanta
 E celková aktivita enzymu v reaktoru
 V celkový objem reaktoru
 h celková výška náplně
 P průtoková rychlost

Pokud nejsou známy hodnoty všech uvedených konstant, lze pro přibližný výpočet relativní výšky náplně v jednotlivých sloupcích vyjít z grafické závislosti konverze penicilinu vázanými buňkami na čas v míchaném reaktoru. Časy potřebné k dosažení určitého stupně konverze jsou pak úměrné celkové výšce náplně nutné k dosažení tohoto stupně konverze. Z toho rovněž

vyplývá, že poměr výšek jednotlivých sloupců závisí na celkové výšce náplně a průtokové rychlosti.

Pro danou kvalitu vázaných buněk a danou koncentraci substrátu a zvolený stupeň konverze je však dán poměr mezi celkovou výškou sloupců a průtokovou rychlostí. Změny kapacity, resp. celkového objemu reaktoru lze při zachování stupně konverze dosáhnout buď současným zvýšením výšky reaktoru a průtokové rychlosti, anebo zvýšením průměru reaktoru. Maximální délka reaktoru je pak omezena hydrodynamickými vlastnostmi biokatalyzátoru. Schéma celé linky na výrobu 6-APK kontinuálním způsobem pomocí vázaných buněk s vysokým obsahem penicilinacylázy je uvedeno na obr. 1. Schéma kontinuální linky pro výrobu 6-APK pomocí vázaných buněk podle obr. 1 je následující.

- 1 Kontinuální příprava demineralizované vody 37 °C teplé
- 2 Kontinuální příprava roztoku benzylpenicilinu
- 3 Kontinuální navažování substance K-soli benzylpenicilinu nebo kontinuální přítok koncentrovaného roztoku penicilinu
- 4 Dávkovací čerpadlo
- 5 Vícečlenný kaskádový sloupcový kontinuální reaktor
- 6 Regulační členy /pH/
- 7 Průtokový chladič
- 8 Odparka
- 9 pH-stat
- 10 Zásobník organického rozpouštědla
- 11 1. kotel pro kontinuální krystalizaci
- 12 Odpad
- 13 2. kotel pro dokrystalizaci
- 14 Zásobník ledové promývací vody
- 15 Zásobník promývacího acetonu
- 16 Bubnová odstředivka
- 17 Sušárna

Předmětem vynálezu je tedy způsob výroby 6-aminopenicilánové kyseliny enzymovou hydrolýzou penicilinu, zejména benzylpenicilinu, vázanými buňkami produkčního mikroorganismu *Escherichia coli* s vysokým obsahem penicilinacylázy, jehož podstata spočívá v tom, že se roztok penicilinu o koncentraci 0,025 až 0,4 mol/litr, s hodnotou pH 7,0 až 8,5, uvádí při teplotě 20 až 50 °C ve styk s buňkami produkčního mikroorganismu *Escherichia coli* vzájemně vázanými chemickou vazbou reakcí s glutardialdehydem a organickým diaminem.

Jako roztoku penicilinu s hodnotou pH 7,0 až 8,5 lze používat roztoku připraveného rozpouštěním pevné substance ve vodě nebo v roztoku pufru nebo získaného v průběhu izolace u filtrátu fermentační pudy, popřípadě zředěného vodou nebo roztokem pufru.

Způsob podle vynálezu lze realizovat například tak, že se roztok penicilinu míchá se suspenzí buněk *Escherichia coli* vzájemně vázaných chemickou vazbou, za úpravy pH na hodnotu 7,0 až 8,0 dávkováním alkálie, přičemž po skončení reakce se částice vázaných buněk oddělí a opakovaně používají ke štěpení penicilinu.

Tento postup lze obměnit tak, že roztok penicilinu recirkuluje pevným ložem buněk *Escherichia coli* vzájemně vázaných chemickou vazbou, o výšce 7 až 30 cm, rychlostí 5 až 20 cm/min., přičemž pH roztoku se po průchodu sloupem upravuje na hodnotu 7,5 až 8,5 dávkováním alkálie, popřípadě tak, že roztok penicilinu s hodnotou pH 7,5 až 8,5 protéká sloupem naplněným buňkami *Escherichia coli* vzájemně vázanými chemickou vazbou, rychlostí 1 až 10 cm/min. nebo protéká postupně alespoň dvěma sloupci

naplněnými pevným ložem buněk *Escherichia coli* vzájemně vázaných chemickou vazbou, rychlostí 1 až 10 cm/min., přičemž před vtokem do každého následujícího sloupce se pH roztoku upravuje na hodnotu 7,5 až 8,5 dávkováním alkálie.

Ke způsobu výroby 6-aminopenicilánové kyseliny podle vynálezu lze účelně používat vázaných buněk s vysokým obsahem penicilinacylázy, připravených z jednotlivých buněk produkčního mikroorganismu postupem podle čs. autorského osvědčení č. 203 607.

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

Příklady provedení

P ř í k l a d 1

Vázané buňky *E. coli* o aktivitě 6,7 j/mg vlhké hmoty byly připraveny postupem podle čs. autorského osvědčení č. 203 607. Materiál měl následující vlastnosti: specifická aktivita 6,7 j/mg vlhké hmoty, suspenze 2,5 g ve 25 ml vody sedimentovala kvantitativně za 3 minuty na objem 8 ml, velikost částic se pohybovala mezi 150 až 225 μm, vlhkost 60 %, tmavohnědé destičky pískovitého charakteru.

500 g vázaných buněk bylo použito k hydrolýze 4,5 l roztoku sodné soli benzylpenicilinu /1 600 j/mg/ o koncentraci 6,5 g/100 ml demineralizované vody. Reakce probíhala při teplotě 37 °C za míchání kotvovým míchadlem v nádobě z nerezavějící oceli, v jejímž dně byla uchycena fritta S 3. V průběhu reakce bylo pH reakční směsi udržováno na hodnotě 7,8 dávkováním čpavkové vody. Po skončení reakce byla kapalina vakuově spodem reaktoru odsáta a zahájena další konverze. Filtrát byl ochlazen na 5 °C a po přidání 1,2 l butylacetátu bylo jeho pH upraveno za stálého míchání na 4,3 kyselinou sírovou zředěnou 1:3.

Po hodině stání byl krystalický produkt odfiltrován a promyt 2krát 250 ml ledové vody a stejným množstvím ledového acetonu. Tímto způsobem bylo provedeno 10 opakovaných konverzí za 24 hodin, přičemž průměrná doba hydrolýzy byla 1,5 hod. a nebyl pozorován pokles aktivity. Celkový výtěžek z 10 konverzí činil 1372 g 6-aminopenicilánové kyseliny o čistotě 98,8 %, což odpovídá výtěžku 79,5 %; obsah nerozpustného zbytku v produktu činil 0,5 %.

P ř í k l a d 2

Příprava 6-aminopenicilánové kyseliny byla provedena stejným způsobem jako v příkladě 1, s tím rozdílem, že jako výchozí materiál byl místo surové sodné soli benzylpenicilinu použit koncentrát vyrobený provedením penicilinu z butylacetátového extraktu filtrátu fermentační pudy do vodné fáze pomocí K_2CO_3 . Koncentrát byl před hydrolýzou naředěn demineralizovanou vodou na koncentraci 100000 j penicilinu G na ml. Ve třech opakovaných pokusech nebyl pozorován pokles aktivity a celkový výtěžek činil 317 g 6-aminopenicilánové kyseliny o čistotě 97,9 %, což představuje 63,2 % teorie; obsah nerozpustného zbytku v produktu činil 4,5 %.

P ř í k l a d 3

Sloupec o velikosti 10 x 20 cm /V = 1570 ml/ byl naplněn 977 g vázaných buněk popsaných v příkladě 1 a promyt 3 litry pufru o pH 7,8, který obsahoval 0,048 mol KH_2PO_4 a 0,026 mol $Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$ na litr. Při teplotě 37 °C protékal sloupem roztok

762 g sodné soli benzylpenicilinu v 11700 ml pufru. Po průtoku sloupcem byl roztok jímán v míchané a temperované nádobě, v níž bylo jeho pH upravováno dávkováním čpavkové vody na hodnotu 7,8 a odtud byl znovu čerpán na sloupec. Po skoušení konverze byl sloupec vymyt jedním litrem pufru. Roztok po konverzi a promývací roztok byly spojeny a ochlazeny na 5 °C. Poté byly přidány 3 litry butylacetátu vychlazeného na 5 °C a pH bylo za stálého míchání upraveno na hodnotu 4,3, kyselinou sírovou zředěnou 1:3. Po 1 hodině krystalizace při teplotě 5 °C byla 6-APK odfiltrována a promyta 2krát 600 ml ledové vody a 2krát 600 ml ledového acetonu. Produkt byl vysušen ve vakuové sušárně při teplotě 40 °C. Výsledky štěpení jsou uvedeny v následující tabulce.

šarže	konverze [%]	průtok /cm/min/	tlakové ztráty na sloupci /atm/
1	92,2	15,1	0,9
2	91,9	13,6	1,0
3	94,1	14,8	0,9
4	95,3	14,2	1,1
5	95,1	10,9	1,2
6	94,9	11,8	1,25
7	95,0	10,5	1,3
8	95,2	10,2	1,3
9	92,7	10,2	1,4
10	94,5	9,6	1,6
11	94,3	9,1	1,5
12	93,3	13,4	1,1
13	93,6	11,6	1,4
14	93,7	9,4	1,5
15	92,4	9,8	1,4

/+/- po skončení šarže 11 byl materiál vyjmut a znovu naplněn do sloupce.

Průměrný výtěžek 6-APK činil 78,3 % při čistotě 98,2 % a obsahu nerozpustného zbytku v produktu 0,5 %.

P ř í k l a d 4

Do čtyř sloupců o výšce 9, 14, 33 a 34 cm a průměru 4 cm opatřených temperačním pláštěm bylo naplněno celkem 704 g vázaných buněk s penicilinacylásovou aktivitou popsaných v příkladě 1. Systém byl promyt 2 litry pufru obsahujícího 0,05 mol KH_2PO_4 a 0,005 mol $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ na 1 litr o pH 8,4. Poté byl zahájen průtok 6%ního roztoku sodné soli benzylpenicilinu ve shora uvedeném pufru rychlostí 3300 ml/hod. při teplotě 37 °C. Po průchodu každým ze sloupců bylo upraveno pH na hodnotu uvedenou v následující tabulce dávkováním 6 N roztoku NaOH:

sloupec	pH na vstupu	pH na výstupu
1	8,4	6,3
2	8,3	6,6
3	8,2	6,9
4	8,1	7,7

Po výtoku z posledního sloupce činila konverze penicilinu 97,5 %. Roztok byl kontinuálně chlazen na 20 °C a vakuově odpařován na 1/3 původního objemu. Poté byl roztok ochlazen na 5 °C a ve tříhodinových intervalech bylo pH koncentráту upraveno kyselinou sírovou ředěnou 2:1 na hodnotu 4,3. Úprava pH byla prováděna za stálého míchání v přítomnosti 600 ml butylacetátu na 1 litr koncentráту. Po hodině krystalizace byla vyloučená 6-aminopenicilánová kyselina oddělena a promyta 2krát 500 ml ledové vody a stejným množstvím ledového acetonu. Produkt byl sušen ve vakuu při 40 °C. Průměrný výtěžek při provozu trvajícím 170 hodin činil 89,2 % při čistotě 98,4 % a obsahu nerozpustného zbytku v produktu 0,5 %. V průběhu výroby nebyl pozorován pokles výtěžku.

P Ř E D M Ě T V Ý N Á L E Z U

1. Způsob výroby 6-aminopenicilánové kyseliny enzymovou hydrolýzou penicilinu, zejména benzylpenicilinu, vázanými buňkami produkčního mikroorganismu *Escherichia coli* s vysokým obsahem penicilinacylázy, vyznačující se tím, že se roztok penicilinu o koncentraci 0,025 až 0,4 mol/litr, s hodnotou pH 7,0 až 8,5, uvádí při teplotě 20° až 50 °C ve styk s buňkami produkčního mikroorganismu *Escherichia coli* vzájemně vázanými chemickou vazbou reakcí s glutardialdehydem a organickým diaminem.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se používá roztoku penicilinu s hodnotou pH 7,0 až 8,5 připraveného rozpuštěním pevné substance ve vodě nebo v roztoku pufru nebo získaného v průběhu izolace z filtrátu fermentační pěstě, popřípadě zředěného vodou nebo roztokem pufru.

3. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že se roztok penicilinu míchá se suspenzí buněk *Escherichia coli* vzájemně vázaných chemickou vazbou, za úpravy pH na hodnotu 7,0 až 8,0 dávkováním alkálie, při-

čemž po skončení reakce se částice vázaných buněk oddělí a opakovaně použijí ke štěpení penicilinu.

4. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že roztok penicilinu recirkuluje pevným ložem buněk *Escherichia coli* vzájemně vázaných chemickou vazbou, o výšce 7 až 30 cm, rychlostí 5 až 20 cm/min., přičemž pH roztoku se po průchodu sloupcem upravuje na hodnotu 7,5 až 8,5 dávkováním alkálie.

5. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že roztok penicilinu s hodnotou pH 7,5 až 8,5 protéká sloupcem naplněným buňkami *Escherichia coli* vzájemně vázanými chemickou vazbou, rychlostí 1 až 10 cm/min.

6. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že roztok penicilinu protéká postupně alespoň dvěma sloupci naplněnými pevným ložem buněk *Escherichia coli* vzájemně vázaných chemickou vazbou, rychlostí 1 až 10 cm/min., přičemž před vtokem do každého následujícího sloupce se pH roztoku upravuje na hodnotu 7,5 až 8,5 dávkováním alkálie.

