



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

223812
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 37/00

(22) Přihlášeno 11 04 72
(11) (PV 2414-72)
(32) (31) (33) Právo přednosti od 28 04 71
(23777 A/71) Itálie
(40) Zveřejněno 25 06 82
(45) Vydáno 15 04 86

(72)
Autor vynálezu

DINELLI DINO dr., SAN DONATO MILANESE, MORISI FRANCO dr., SAN GIOVANNI IN PERSICETO (Itálie)

(73)
Majitel patentu

ANIC, S.p.A., PALERMO (Itálie)

(54) Způsob výroby 6-aminopenicillanové kyseliny

1

2

Vynález se týká způsobu výroby 6-aminopenicillanové kyseliny hydrolýzou penicilinu G, při kterém se vodný roztok penicilinu G o koncentraci 1 až 6 % hmotnost/objem hydrolyzuje při pH v oblasti 8 v přítomnosti penicilinacylázy uložené ve vláknech z triacetátu celulózy.

Vynález se týká způsobu výroby kyseliny 6-aminopenicillanové enzymatickým štěpením přírodního penicilinu G.

Způsob podle vynálezu je založen na použití enzymatických přípravků, které jsou uloženy ve vlákně učiněny nerozpustnými. Tím se dosáhne značného zlepšení vlastností konečného produktu a významného zjednodušení operací a v důsledku toho i snížení ceny.

Je známo, že již několik let je 6-aminopenicillanová kyselina (dále také 6-APA) cennou výchozí látkou pro výrobu polosyntetického penicilinu.

Příprava 6-APA přímou fermentací pomocí *Penicillium chrysogenum* v nepřítomnosti prekursoru je po technické stránce velmi složitá a výtěžky jsou velmi nízké.

Nedávno byly navrženy chemické způsoby, které jsou relativně nákladné, vyžadují speciální technologii v důsledku nestálosti výchozích a konečných produktů a způsobují rozklad produktů, spojený se značnými ztrátami.

Při používaných enzymatických způsobech se používá buněk vhodných mikroorganismů, které vyrábějí penicilinacylásu. Jelikož se těchto buněk může použít pouze jednou při relativně vysoké koncentraci (pro zkrácení doby hydrolýzy), je třeba čas od času fermentací vyrobit buňky obsahující enzym.

Kromě toho extrakce hydrolytického produktu 6-APA z reakční směsi je velmi složitá a výsledný produkt vyžaduje opakovanou krystalizaci a velmi často obsahuje bílkovinný materiál, který způsobuje, pokud se neodstraní, například rozkladem proteolytickými enzymy, alergie při použití výsledných penicilinů.

To všechno zvyšuje ceny a způsobuje, že je výrobní technologie značně složitá.

Způsob podle vynálezu představuje v tomto ohledu značné zlepšení.

Enzymatické přípravy uložené do vláknité struktury si udržují svou účinnost po velmi dlouhou dobu. Vzorky tohoto typu si při opakujících se pracovních cyklech udržely svou účinnost po 12 měsíců takřka neměněnou.

Prodloužená účinnost struktur podle vynálezu má vedle zřejmých výhod navíc výhodu ve zjednodušení způsobu, přičemž vliv ceny enzymatického katalyzátoru na výslednou cenu produktu je velmi malý nebo takřka zanedbatelný.

Předmětem vynálezu je způsob výroby 6-aminopenicillanové kyseliny hydrolýzou penicilinu G, vyznačující se tím, že se vodný roztok penicilinu G o koncentraci 1 až 6 proc. hmotnost/objem hydrolyzuje při pH v oblasti 8 v přítomnosti penicilinacylázy uložené ve vlákněch z triacetátu celulózy.

Vlákně obsahující enzym vyrobené zvlákněním se před použitím promyje, aby se odstranily z vnějšku adsorbované nečistoty, a potom se ho použije na katalýzu reakce. Vzhledem k tomu, že protein nemůže di-

fundovat do reakčního prostředí, získá se vysoce čistý produkt, který kromě jiného neobsahuje bílkovinné nečistoty tak nebezpečné v důsledku alergických reakcí. Katalyzátoru, který je úpravou podle vynálezu zbaven rozpustnosti, se může použít diskontinuálně. Katalyzátor se uvede do styku s reakční směsí, po skončení jeho působení, tj. hydrolýzy penicilinu, se oddělí od reakční směsi a uvede do styku s novou šarží čerstvé směsi.

Stejného katalyzátoru se může rovněž použít při kontinuálním způsobu v koloně. Roztok penicilinu v koloně, vhodně pufrovaný, se vede kolonou obsahující vlákně s enzymem. Vhodným nastavením rychlosti toku a množství vlákně je možno získat vytékající směs s nejvyšším stupněm hydrolýzy.

Enzymatický katalyzátor se připravuje způsobem popsaným v italském patentu č. 836 462. Podle tohoto patentu se vlákně s uloženým enzymem mohou vyrobit zvlákněním roztoků vláknitvorných polymerů, ve kterých jsou dispergovány enzymatické přípravky ve velmi malých kapičkách o velikosti řádově stejné, jako jsou kapičky emulze.

„Emulze“ se mohou zvlákněvat za sucha nebo za mokra. Získané vlákně obsahuje uvnitř drobné dutiny, ve kterých jsou uloženy enzymy. Enzymy jsou odděleny od okolí velmi tenkou membránou, která zabraňuje uniknutí enzymů a jejich dispergaci v reakční směsi, ale umožňuje jejich katalytické působení.

Jako vláknitvorného polymeru se pro uložení enzymu v případě způsobu podle vynálezu používá triacetát celulózy.

Jako enzymatického materiálu se může použít surového extraktu získaného z buněk bakterií (*E. coli*, *B. Megaterium*, *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes faecalis* atd.).

Při hydrolýze, kterou se má získat 6-APA, se může vycházet z vodného roztoku použité soli penicilinu o koncentraci v rozmezí 1 až 6 % (hmotnost/objem), přednostně o koncentraci 2 až 3 %. Hodnota pH roztoku se udržuje okolo 8,0 automatickým přidáváním zásady.

Při kontinuálním provozu se může použít vhodně tlumeného roztoku penicilinu, protože regulace pH v různé výšce kolony je obtížná.

Hydrolýza penicilinu G (benzylpenicilinu) se může provádět při teplotě od 15 do 60 stupňů Celsia, výhodně od 37 do 40 °C.

Příklad 1

Za míchání se v reaktoru rozpustí 20 g triacetátu celulózy (Fluka) ve 280 g methylenchloridu (C. Erba). V jiné nádobě se připraví roztok enzymu následujícím způsobem: buňky *Escherichia Coli* (60 g vlhké váhy), získané fermentací na vhodném prostředí v přítomnosti kyseliny fenyloctové,

se převedou do fosfátového pufru 0,01 M o pH 7,0. Surový produkt, který se takto získá, se zahřívá tři minuty na 50 °C a poté se sráží srážením amonným až do dosažení pH 5,5. Frakce získaná v rozmezí hodnoty 25 až 75 % nasycení se oddělí. Tato frakce se rozpustí v 30 ml fosfátového pufru 0,01 M o pH 8, obsahujícího 30 % objemových glycerinu. Získaný enzymatický roztok se přidá k roztoku polymeru. Emulgace obou fází se dosáhne intenzivním třicetiminutovým mícháním při 0 °C.

Emulze se převede do malého zásobníku, udržovaného při teplotě -6 °C, a potom se pod dusíkem zvlákní. Koagulace vláken se provádí v toluenu při teplotě místnosti.

Toluen se odstraní několikahodinovým vakuovým sušením.

Do skleněné kolony, vybavené termostatovaným pláštěm o výšce 70 cm a průměru 3 cm, se umístí 37 g vláken. Vláknina se promývá vodou a glycerinem až do vymizení bílkovin z promývacích luhů.

Kolonou se nechá cirkulovat 600 ml vodného roztoku 2 % hmotnostních [hmotnost/objem] draselné soli penicilinu G (Squibb). Hodnota pH se udržuje na 8,0 kontinuálním přidáváním 0,5 N NaOH pomocí zařízení k udržování konstantního pH. Kolona se termostatuje na 37 °C. Po 5 hodinách, kdy se rychlost spotřeby sody sníží na 1/20 původní hodnoty, se reakční směs odtáhne, zchladí na 3 °C, okyslí 2 N HCl na pH 3,0 (33,5 ml 2 N HCl) a extrahuje dvakrát 200 ml butylacetátu.

První extrakt obsahuje 298 mg a druhý extrakt 2 mg penicilinu (stanovení pomocí hydroxylaminu). Vzhledem k tomu, že celkové množství nasazeného penicilinu bylo 12 g, je konverze 97 %. Chromatograficky se nezjistí žádné rozkladné produkty. Hodnota pH vodné fáze (800 ml), prostě zbytku nezreagovaného penicilinu a kyseliny fenyloctové, se upraví přidáním 33 ml 2 N NaOH na 7,0 a poté se za vakua při 37 °C odpaří na objem 110 ml.

Koncentrovaný roztok 6-APA se ochladí na 0 °C a jeho pH se upraví 3 N HCl na 4,2. 6-APA se vysráží, odfiltruje a za vakua vysuší při 45 °C do konstantní hmotnosti (6,6 gramu).

Obsah 6-APA ve vodných matečných loužích z krystalizace (130 ml) je 0,4 % hmot.

Obsah 6-APA v krystalickém produktu stanovený pomocí hydroxylaminu je 97,5 %. Infračerveným spektrem, chromatografií a měřením optické otáčivosti se potvrdí, že se jedná o prakticky čistý produkt.

V průběhu 6 měsíců se přesně stejným jako shora popsaným způsobem provede 10 příprav 6-APA, vždy za použití stejných vláken obsahujících enzym, aniž dojde k cítnému poklesu produktivity.

Příklad 2

Postupuje se za stejných podmínek jako

v příkladu 1 a zvlákněním se vyrobí vlákno s uloženým enzymatickým přípravkem z buněk *Escherichia Coli*, přečištěným stejným způsobem jako v příkladu 1, ale patnáctkrát.

Aktivita stejného množství vláken jako v předcházejícím příkladu je desetkrát vyšší.

Do stejné kolony jako v příkladu 1 (objem 480 ml) se uvede 37 g vláken. Vláknina se promyje vodou a glycerinem až do vymizení bílkovin z promývacích luhů.

Do zásobníku o objemu 5 l se na počátku uvedou 3 l vodného roztoku draselné soli penicilinu G (Squibb) o koncentraci 2 % hmot.

Roztok se kontinuálně čerpá do kolony s vláknem přes zásobník. Aby se snížila doba hydrolýzy, je třeba zajistit naprostou homogenitu reakčního prostředí, směs v zásobníku se proto intenzivně míchá a recirkuluje se rychlostí 500 ml/min.

Hodnota pH se udržuje na 8,0 přidáváním vodného 0,5 N NaOH pomocí zařízení k automatickému udržování pH. Teplota reakční směsi se automaticky udržuje na 37 °C termostatováním kolony.

Průběh hydrolýzy se může sledovat na základě spotřeby roztoku NaOH, registrované na zapisovači. Po dvou hodinách a 10 minutách klesne rychlost spotřeby hydroxidu sodného na méně než 5 % původní rychlosti. V tomto okamžiku se reakce zastaví a směs se odebere z oběhu. Spotřeba 0,5 N NaOH je 310 ml. Z oběhu se odtáhne celkem 3300 ml volného roztoku, obsahujícího 6-APA, kyselinu fenyloctovou, vzniklé hydrolýzou a zbytek nezreagovaného penicilinu.

Kyselina fenyloctová a penicilin se z reakční směsi odstraní extrakcí butylacetátem. Extrakce se provádí dvakrát vždy 1100 mililitry čerstvého rozpouštědla následujícím způsobem:

Reakční směs se umístí v zásobníku o objemu 6 l, vybavené míchadlem. Po ochlazení na 5 °C se hodnota pH nastaví přidávkou vodného 1 N roztoku HCl na 3. Přidá se 1100 ml butylacetátu a mícháním se provede dobrá dispergace mezi vodnou organickou fází. V průběhu míchání po dobu 15 minut se kontinuálním přidáváním 1 N HCl udržuje pH na konstantní hodnotě. Poté se nechá směs 20 minut stát při 5 °C. U dna se vytvoří vodná fáze, která je lehce zakalena přítomností stop rozpouštědla ve formě velmi jemných kapiček, vrchní vrstvu tvoří čistá organická fáze. Fáze se rozdělí v děliči a z emulze butylacetátu ve vodné fázi se čistá vodná fáze získá odstředěním.

Celé množství vodné fáze se zpracuje ještě jednou stejným způsobem s 1100 ml čerstvého rozpouštědla a vodná fáze se izoluje stejným způsobem. V průběhu obou extrakcí se použije 180 ml vodného 1 N roztoku HCl.

V obou butylacetátových frakcích se zjišťuje za použití hydroxylaminu přítomnost

penicilinu. V první frakci, pocházející z první extrakce, je obsah penicilinu 3 mmol/l, ve druhé frakci není penicilin obsažen.

Hodnota pH vodné fáze, získané při extrakci, se upraví přidáním 165 ml vodného 1 N roztoku NaOH na 6,9 a potom se vodná fáze za vakua odpaří v rotačním odpařováku. Termostatovaná lázeň rotačního odpařováku se udržuje při 45 °C, teplota chladicí kapaliny v kondenzátoru je -5 °C, tlak na sací straně vývěvy je 1 torr. V průběhu 5 hodin se objem vodné fáze sníží na 1,8 původního objemu.

Zbytek se převede do jednolitrové baňky, ochladí se na 2 °C a potom se přidávkem 6 N HCl upraví na 4,2. Během úpravy pH se vysráží v krystalické formě 6-APA. Sraženina se oddělí vakuovou filtrací a potom se za vakua vysuší (0,5 torru při 45 °C) do konstantní hmotnosti. Získá se 32,4 g produktu. Matečné louhy z krystalizace (450 mililitru) se titrují hydroxylaminem a zjis-

tí se, že obsahují 180 mmol/l 6-APA, což odpovídá 0,39 % hmot.

Získaná 6-APA se znovu rozpustí ve vodě a titruje hydroxylaminem. Porovnáním se standardním roztokem velmi čisté 6-APA, přečištěné několikanásobným překrystalováním, se zjistí, že obsah čisté 6-APA v produktu je 98,5 %. Z původních 161 mmolů penicilinu se získá

$$\frac{32,4 \times 0,985}{216} = 147 \text{ mmolů 6-APA.}$$

Za předpokladu, že výchozí produkt je čistý, je celkový výtěžek 6-APA 91,4 % teorie.

Při kontinuálním provozu se mohou matečné louhy z krystalizace částečně recyklovat a potom vakuově odpařovat. Tím lze celkový výtěžek produktu zvýšit až do mezí hodnoty 95 % teorie.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby 6-aminopenicillanové kyseliny hydrolýzou penicilinu G, vyznačující se tím, že se vodný roztok penicilinu G o koncentraci 1 až 6 % hmotnost/objem hydrolýzuje při pH v oblasti 8 v přítomnosti penicilinacylázy uložené ve vlákních z triacetátu celulózy.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že na hydrolýzu se používá vodného roztoku penicilinu G o koncentraci 2 až 3 % hmotnost/objem.

3. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se roztok penicilinu G přivádí do hydrolyzační zóny spolu s pufrem.