



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

218182

(11)

(B1)

(22) Prihlášené 11 05 81
(21) (PV 3460-81)

(40) Zverejnené 28 05 82

(45) Vydané 15 09 84

(51) Int. Cl.³
C 12 N 1/02

(75)

Autor vynálezu

JAKUBOVÁ ANTONIA ing., BUČKO MICHAL ing. CSc., MIKLÁŠ EMIL ing., BULLA JÁN ing., BANSKÁ BYSTRICA, VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc., ČULÍK KAREL RNDr., PRAHA, LUKÁŠ KRÁL RNDr., MARTIN, VARGA VLADIMÍR ing., DAUCÍK ADAM, KRNÁČ JURAJ, LALÍK IVAN, BANSKÁ BYSTRICA

(54) Spôsob čírenia konverzných zmesí pri biosyntetických výrobách

V prihláske je navrhnutý spôsob čírenia disperzných systémov pri biosyntetických výrobách. Na čírenie sa používajú malé množstvá kationaktívnych alebo anionaktívnych polyelektrolytov vyrábaných na báze polyetylénimínov alebo polyakrylamidov.

Pracuje sa v širokom rozmedzí teplôt a pH.

Na separáciu pevných podielov je v týchto prípadoch potom možné použiť bežné filtračné a separačné zariadenia.

Vynález sa týka spôsobu čírenia konverzných zmesí pri biosyntetických výrobách.

Výroba mnohých látok používaných najmä v potravinárskom, farmaceutickom a iných odvetviach priemyslu je možná len biosyntézou. V skutočnosti je každý biologický proces sledom enzymatických reakcií, pri ktorých z východziech substrátov vznikajú a izolujú sa požadované produkty. Takto je napr. možné previesť pri výrobe kyseliny askorbovej sorbit na sorbózu, kyselinu fumarovú na kyselinu asparágovú, 6-azauracil na 6-azauracilribozid, sacharózu na kyselinu glukónovú a získavať kyselinu 6-aminopenicilánovú zo solí penicilínov.

Príprava týchto látok sa realizuje v podstate tak, že sa pripraví kultúra biologicky aktívneho materiálu a po odseparovaní fermentačného média sa použije na enzymatickú konverziu.

V niektorých prípadoch však nie je ani potrebné biologicky aktívnu kultúru z fermentačného média separovať, konverzia sa robí pridaním substrátu k enzymaticky aktívnej kultúre počas fermentácie.

V poslednom čase sa tieto procesy sústavne zdokonaľujú. Dôkazom je tá skutočnosť, že sa na enzymatické konverzie čoraz viac používajú postupy, pri ktorých sa enzým izoluje z buniek producenta a naviaže sa na vhodný nosič. Takéto postupy sú však nákladné. Ekonomicky výhodnejšie sú tie procesy pri ktorých sa enzým neizoluje, ale bunky producenta sa naviažu na vhodný anorganický, organický alebo prírodný nosič. Takto pripravený biokatalyzátor sa použije na enzymatickú konverziu.

V ČSSR sa realizuje priemyslová výroba kyseliny 6-aminopenicilánovej (ďalej len 6-APK) a kyseliny L-asparágovej enzymatickou cestou. Postupuje sa tak, že sa enzým z kultúry producenta neizoluje. Na enzymatickú konverziu sa používajú buď samostatné bunky, v ktorých je enzým viazaný pomocou chemických činidiel, alebo natívne bunky zabudované vo vhodnom nosiči. Výhoda týchto postupov je v tom, že takto pripravené biokatalyzátory sa môžu používať na enzymatické reakcie opakovane, čo značne zhoršodráňuje výrobný proces.

Nedostatok týchto postupov spočíva v tom, že sa bunky pri opakovanom používaní následkom mechanických operácií porušujú, prípadne sa uvoľňujú zo zabudovaného nosiča. Po odseparovaní podstatnej časti biokatalyzátora vznikne disperzný systém s veľmi jemnými častočkami. Ich veľkosť sa pohybuje v rozmedzí 0,1—1 μm . Takýto systém nie je možné vyčistiť na bežne používaných kontinuálne pracujúcich odstredivkách. Vzhľadom na to, že v niektorých prípadoch napr. pri enzymatickej príprave 6-APK je výsledný produkt enzymatickej reakcie vo vodných roztokoch málo stabilný, musí sa počas izolácie spracovávať rýchlo. V takýchto prípadoch nie je vôbec možné použiť na čírenie klasické filtračné zariadenia ako napr.

nuče, tlakové alebo vákuové filtre. Filtračné dosky, prípadne pomocná filtračná hmota sa rýchlo zanesie malými častočkami, rýchlosť filtrácie sa spomaľuje až klesne na nulu.

Ďalšia nevýhoda spočíva v tom, že ak je konverzná zmes po enzymatickej reakcii zakalená, zhoršuje v mnohých prípadoch izoláciu a kvalitu výsledných produktov. Tak napr. pri výrobe 6-APK pri terajšom spôsobe výroby, býva konečný produkt v rôznej miere znečistený fragmentami buniek, príp. celými bunkami. Tieto nie je možné odstrániť z kryštálu ani viacnásobným premývaním. Pri konverzii 6-APK na polosyntetické penicilíny môžu tieto častočky v konečnom dôsledku ovplyvniť výťažnosť a kvalitu konečnej liekovej formy.

Podobné problémy nastávajú aj pri ostatných biosyntetických výrobách.

Pokusmi sme overili, že v takýchto prípadoch je možné získať číre roztoky, ak po separácii biokatalyzátora sa ku kvapaline pridá malé množstvo polyelektrolytu.

Polyelektrolyty ako je známe, sú lineárne alebo rozvetvené polyméry s vysokým polymerizačným stupňom. Ich charakteristickou vlastnosťou je veľmi dobrá rozpustnosť vo vode. Už v nízkych koncentráciách tvoria viskózne roztoky. V roztoku tieto polyméry disociujú ako dlhé vlákna o dĺžke niekoľko desiatok μm . Rozhodujúci význam pre charakter organických polyelektrolytov má povaha aktívnych skupín, ktoré sú naviazané na polymérnom reťazci. Najbežnejšie sa vyskytujú skupiny neionické ($-\text{CONH}_2$), anionické ($-\text{COOH}$), alebo kationické ($-\text{NH}_2$, $-\text{NH}$) a pod.

Účinky organických polyelektrolytov podmieniajú hlavne tieto dva faktory:

- naviazanie rôznych častí dlhého reťazca makromolekuly na častočky disperzného systému Wan der Waalsovými silami, čím sa tieto častočky premestia, za tvorby väčších častíc s vysokou pórovitosťou — flokul. Tieto flokuly potom ľahšie sedimentujú, čím dochádza k číreniu disperzného systému.
- elektrický náboj funkčných skupín polyméru pomáha zvyšovať jeho rozpustnosť a výrazne ovplyvňuje tvar molekuly v roztoku. Tým sa napomáha tvoreniu mostíkov časticami. Významnejší je však účinok elektricky nabitých funkčných skupín na elektricky nabitú časticu polydisperzného systému. Pomáhajú neutralizovať náboj týchto častíc a tým urýchľujú flokuláciu a sedimentáciu.

Výhoda navrhovaných polyelektrolytov spočíva v tom, že ich možno použiť v širokom teplotnom rozmedzí. pH sústavy počas reakcie sa môže pohybovať od silne kyslej, až po mierne alkalickú. Pôsobia už v nepatrných koncentráciách. Je potrebné aby sa pridávali v dostatočne zriedenom vodnom roztoku. Najvýhodnejšie sú roztoky, v ktorých je koncentrácia polyelektrolytu 0,1—0,25 % n-ná. Takto zriedené roztoky sú však málo stabil-

né. Ich životnosť je maximálne 24 hodín. Z tohoto dôvodu je potrebné pripravovať si zásobný roztok o koncentrácii 0,5—1 % a tento pred upotrebením nariediť.

Z dostupných odskúšaných polyelektrolytov sa nám pri riešení tohoto problému najlepšie osvedčili kationaktívne príp. anioaktívne polyelektrolyty vyrábané na báze polyetylénimínu a polyakrylamidu.

Tieto reagujú a fragmentami buniek, príp. s celými bunkami biokatalyzátora. Vznikajú flokuly, ktoré sú niekoľkonásobne väčšie než fragmenty buniek a preto je na vyčistenie takto upraveného systému možné použiť bežné filtračné zariadenia.

Princíp nami navrhovaného postupu spočíva v tom, že k reakčnej zmesi po predchádzajúcej separácii biokatalyzátory sa po prípadnej úprave pH pridá predpísané množstvo polyelektrolytu. Sústava sa krátko premieša a nechá v pokoji tak dlho kým systém vyflokuluje. Potom sa pevný podiel separuje na vhodnom separačnom alebo filtračnom zariadení.

Výhoda tohto postupu spočíva v tom, že sa získa úplne číry filtrát. Takýmto spôsobom je možné bez väčších nákladov (surovinových a investičných) štandardizovať napr. výrobu 6-APK, kyseliny asparágovej a iných duktov chemických reakcií.

Zlepšia sa tým podmienky kryštalizácie, produkty sú úplne biele a bez akýchkoľvek prímiesi bunkových fragmentov. Vytvorí sa lepšie podmienky pre konverziu 6-APK na polosyntetické penicilíny, príp. kys. asparágovej na umelé sladidlo. Táto skutočnosť pozitívne ovplyvní aj výťažnosť výsledných produktov reakcií.

Spôsob realizácie bližšie objasňujeme na viacerých príkladoch.

Príklad 1

200 ml konverznej zmesi o obsahu 36,6 g.l⁻¹ 6-APK sa upraví s H₂SO₄ na pH 6,5. Pridá sa 0,2 ml roztoku Sedipuru CL 930 o koncentrácii 5 g.l⁻¹ (výrobca firma BASF-Ludwigshafen NSR). Sústava sa krátko premieša a nechá stáť v pokoji 15 minút. Potom sa filtruje vákuové za pomoci filtračnej hmoty — kremelíny. K vyčistenému filtrátu sa pridať 50 ml butylacetátu a zmes sa ochladí na 5 °C. pH sa upraví pomocou H₂SO₄ na 4,2. Kryštalizuje 2 hod. za chladenia a občasného premiešavania. Získaný kryštál sa oddelí, premyje rozsuspenderovaním striedavo v schladenej vode a acetóne. Suší sa 2 hodiny pri 40 °C vo vákuovej sušiarňi. Získa sa 5,8 g 6-APK, čo predstavuje 79,23 %-nú výťažnosť.

Príklad 2

300 ml zmesi, ktorá obsahuje 16,5 g.l⁻¹ 6-APK sa upraví pH na 8,0. Pridá sa k nej 1,5 ml roztoku Magnaflocu 155 (vyrába firma Allied Colloids — Anglia) koncentrácia 2,5 g.l⁻¹, dôkladne sa premieša a nechá v po-

koji 10 min. Tekutina sa potom rovnomerne rozdelí do kyviat a vyčirí na laboratórnej odstredivke pri 4000 obr./min. Úplne číry supernatant sa kvantitatívne vpraví do banky. Zahustí sa na vákuovom rotačnom odparovacom zariadení pri 40 °C na 150 ml. Ďalší postup získania kryštálu je rovnaký ako v príklade 1. Získa sa 3,46 g bieleho kryštálu 6-APK. Výťažnosť pokusu je 69,9 %-ná.

Príklad 3

200 litrov roztoku 6-APK o koncentrácii 36,2 g.l⁻¹ sa upraví na pH 6,4 s H₂SO₄. Pridá sa 0,5 litra sedipuru CF 900 (vyrába firma BASF — NSR), o koncentrácii 2,5 g.l⁻¹.

Roztok sa mieša 5 minút a nato ponechá v pokoji 15 minút. Sústava sa sfiltruje na rotačnom vákuovom filtri za pomoci kremelíny. Úplne číry filtrát sa ochladí na teplotu 5 °C, pridá sa k nemu 60 litrov butylacetátu a za miešania sa upraví pH na hodnotu 4,2 pomocou kyseliny sírovej o konc. 250 g.l⁻¹. Ďalší postup je rovnaký ako v príklade 1. Získa sa 5780 g bieleho kryštálu 6-APK o čistote 98,4 %. Obsah rozkladných látok je 0,64 %.

Príklad 4

1800 litrov konverznej zmesi, ktorá obsahuje 33,5 g.l⁻¹ 6-APK, po oddelení biokatalyzátora sa upraví na pH 6,7 kyselinou sírovou o konc. 250 g.l⁻¹. K tomuto roztoku sa pridá 10 litrov vodného roztoku Praestolu A 751 (vyrába Chemische Fabrik Stockhausen — NSR) o koncentrácii 2,5 g.l⁻¹. Zmes sa dôkladne mieša 5 minút a 15 minút sa nechá stáť. Potom sa filtruje cez tlakový filter s azbestocelulózovými filtračnými doskami. Získa sa číry filtrát, priepustnosť ktorého meraná na spektrofotometri Specol pri vlnovej dĺžke 510 nm je 98,0 %. Filtrát sa ďalej spracováva obvyklým spôsobom. Získa sa 54,5 kg 6-APK, čo odpovedá výťažku 79,8 %. Produkt je bielej farby s obsahom 6-APK 97,5 %. Obsah rozkladných produktov je 0,57 %.

Príklad 5

Z 2000 litrov konverznej zmesi, ktorá obsahuje 150 g.l⁻¹ kyseliny asparágovej sa odstráni biokatalyzátor na separátore BRPX — 213 Alfa-Laval. pH filtrátu sa upraví s H₂SO₄ o konc. 400 g.l⁻¹ na 5,8. Pridá sa k nemu 20 lit. roztoku sedipuru CF 900 (vyrába BASF — NSR) o konc. 1,25 g.l⁻¹.

Dôkladne sa rozmieša a nechá stáť 30 minút. Filtruje sa na vákuovej nuči cez pomocnú filtračnú hmotu napr. kremelinu. Číry filtrát sa upraví na pH 2,8 pomocou roztoku kyseliny sírovej o konc. 400 g.l⁻¹. Nechá sa kryštalizovať pri zníženej teplote 2 hodiny. Kryštál sa separuje na bubnovej odstredivke. Premýva sa 2× chladenou H₂O a 1× chladeným etanolom. Získa sa 278,6 kg kys. asparágovej o čistote 98,5 %.

Príklad 6

Z 2000 litrov konverznej zmesi, ktorá obsahuje $36,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ 6-APK sa oddelí biokatalyzátor na separátore BRPX 213 Alfa-Laval. pH tekutiny sa upraví na 6,6 kyselinou sírovou. K sústave sa pridá 8 lit. sedipuru CL 930 o koncentrácii $2,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Dôkladne sa pre-

mieša a nechá stáť 20 min. Potom sa sústava separuje na kontinuálnej odstredivke AX 213 Alfa-Laval. Číry filtrát sa ďalej spracováva obvyklým postupom. Dosiahne sa $80,8 \%$ -nej výťažnosti. Obsah účinnej látky v získanom preparáte je $97,4 \%$ -ný; obsah rozkladných produktov je $0,74 \%$.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob čírenia konverzných zmesí pri biosyntetických výrobách vyznačujúci sa tým, že disperzný systém sa flokuluje prísadou kationaktívnych príp. anionaktívnych polyelektrolytov na báze polyetylénimínov alebo

polyakrylamidov, pridávaných vo forme roztoku vo vode, v množstve 1 až $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, s výhodou $12,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, pri teplote 0 až 50°C a pri pH 1 až 9.