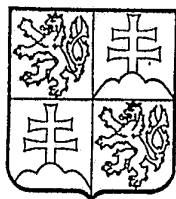


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

273 203

(21) PV 9878-87.T
(22) Přihlášeno 27 12 87

(40) Zveřejněno 12 07 90
(45) Vydáno 20 01 92

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 12 M 1/40

(75) Autor vynálezu

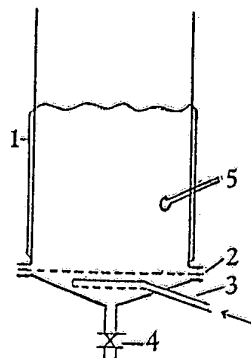
ČULÍK KAREL RNDr.,
VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc., PRAHA,
BUČKO MICHAL ing. DrSc.,
MIKLÁŠ EMIL ing.,
JAKUBOVÁ ANTONIA ing., BANSKÁ BYSTRICA,
STUCHLÍK JOSEF ing., HRABYNĚ

(54)

Způsob enzymových výrob a zařízení
k provádění tohoto způsobu

(57) Řešení se týká způsobu a zařízení
pro enzymové výroby pomocí zrnitých fil-
trbilních biokatalyzátorů a jeho využí-
vání vsádkově nebo kontinuálně.

Výhodou způsobu a zařízení je pneu-
matický způsob míchání reakční suspenze
s malým smykovým namáháním gelovitých zr-
nek biokatalyzátoru, a tím dlouhá život-
nost biokatalyzátoru. K rozptýlu bublin
plynu v kapalině při pneumatickém míchání
a k filtraci reakční směsi od částic zr-
nitých biokatalyzátorů slouží dvousměrně
pracující filtrační člen u dna reaktoru.
Reaktor pracuje buď vsádkově, mnohonásob-
ně opakovaně při setrvání zrnitého bio-
katalyzátoru v reaktoru, nebo při zapoje-
ní nejméně dvou reaktorů v sérii, konti-
nuálně. Zařízení je zvláště vhodné pro
výrobu 6-aminopenicilánové a 7-aminodea-
cetoxy cefalosporánové kyseliny imobili-
zovanými bunkami nebo enzymy.



Vynález se týká způsobu enzymových výrob a zařízení k provádění tohoto způsobu pomocí zrnitých typů biokatalyzátorů.

Pro enzymové výrobní procesy, zejména pro enzymové přeměny roztoků přírodních penicilinů na kyselinu 6-aminopenicilánovou (6-APK) nebo pro obdobné procesy příprav kyseliny 7-aminodeacetoxycefalosporánové (7-ADCK), respektive kyseliny 7-aminocefalosporánové (7-ACK), byla popsána nebo navržena řada aparaturních a procesních řešení pracujících vsádkově nebo kontinuálně.

M.D. Lilly shrnul ve svých pracech (Methods of Enzymology, Vol. XLIV, Academic Press 1976 a 1979) poznatky o výběru, konstrukci a funkci reaktorů pracujících se zrnitými biokatalyzátory na bázi imobilizovaných enzymů. Autor se také zabýval reaktory pro enzymové štěpení penicilinů, kdy je nutno respektovat omezenou stabilitu jak výchozí látky, použitého imobilizovaného enzymu, tak substrátu a výsledného produktu (například 6-APK) při respektování požadavku stálé regulace měnícího se pH reakční směsi.

Často se uvádí použití průtočných reaktorů v kolonovém uspořádání, naplněných částicemi biokatalyzátoru. Například US patent č. 3 953 291 používá kolon naplněných imobilizovanými baňkami. Nevýhodou tohoto aparaturního řešení je nepřesná kontrola pH a horší využití enzymu oproti optimálním hodnotám. US patent č. 4 113 566 se snaží uvedené nevýhody eliminovat způsobem spočívajícím v rychlé recirkulaci zpracovaného roztoku mělkým ložem částic biokatalyzátoru - tedy v principu opět sloupcem částic biokatalyzátoru. Získaná výhoda přesné regulace pH je spojena s nevýhodou tohoto uspořádání, spočívající v tom, že značná část zpracovávaného roztoku, a to mnohdy více jak 50 % je při cirkulaci mimo stálý kontakt s částicemi biokatalyzátoru a po celou dobu enzymové hydrolýzy je neúčelně vystavena degradačním vlivům teploty a změnám pH.

Čs. autorské osvědčení č. 213 099 řeší uspořádání aparatury na kontinuální štěpení roztoku penicilinu ve dvou nebo více propojených, mechanicky míchaných kotlích se stálou úpravou pH přítokem roztoku alkálie. Míchaná náplň suspensního biokatalyzátoru zůstává ve vznosu a před únikem na výtok z kotle je zadržována filtračními členy. Toto, jinak jednoduché uspořádání, zahrnuje však nevýhodu všech mechanicky míchaných reaktorů, kdy smykový účinek míchadla vede dříve nebo později k desintegraci částic biokatalyzátoru a jejich úlomky buď filtrem podchází, nebo, je-li hustý, filtr ucpávají.

Snaha používat zrnité typy biokatalyzátorů tvrdé konsistence, které mechanickému namáhání míchadlem lépe odolávají je opět spojena s nevýhodou, že mechanicky odolné typy částic biokatalyzátorů mají v důsledku omezené bobtnavosti nižší specifickou aktivitu ve srovnání s biokatalyzátory obsahující stejné enzymy, ale s vyšší bobtnavostí. Tyto protichůdné požadavky na vlastnosti částic biokatalyzátorů vedou obvykle k vývoji a používání biokatalyzátorů s kompromisními parametry.

Čs. autorské osvědčení č. 209 676 uvádí v příkladu 1 mechanicky míchaný reaktor s 10% suspenzí zrnitého biokatalyzátoru daných vlastností. Přepočtem lze určit, že byla použita koncentrace 770 jednotek enzymové aktivity G-penicilinamidázy na ml štěpeného 6% roztoku penicilinu G. Štěpný proces trval 10krát opakovaně 90 minut. V příkladě 4 téhož čs. autorského osvědčení při kontinuálním procesu na aparatuře 4 sloupců naplněných biokatalyzátorem spojených za sebou bylo v nehybných průtokových vrstvách částic biokatalyzátoru stejného typu jako v příkladu 1 použito prostorové koncentrace enzymové aktivity 4.174 jednotek na ml. Výsledkem tohoto postupu bylo urychlení štěpného procesu na 20 minut, vypočteno z průtokové rychlosti. Zrychlení průběhu enzymové reakce bylo takového rázu, že přes zatížení roztoku penicilinu-G puřem a přesto, že na vstupu bylo použito vysokého pH 8,4 ohrožujícího stabilitu substrátu i biokatalyzátoru, došlo již po průchodu prvním členem kaskády s pevným

ložem biokatalyzátoru (o výšce pouhých 9 cm) k neúnosnému snížení pH na hodnotu 6,3 na výtoku ze sloupce.

Oba uvedené příklady ilustrují kontrastní přístup k technologickému řešení procesu enzymové biotransformace betalaktamových antibiotik.

U míchaných reaktorů se v praxi vyžaduje, aby zrnitý biokatalyzátor, již z důvodů jeho vysoké ceny, vydržel minimálně 400 až 500 výrobních cyklů, tj. asi 800 až 1 000 hodin provozu, za intenzivního míchání. Použití pufrovaných roztoků penicilinů se vylučuje pro zvýšené materiálové náklady a pro sníženou izolaci produktů enzymové přeměny z pufrovaného roztoku.

Ve výrobní praxi se nejčastěji používají například pro enzymové štěpení penicilinu zatím typizované nespecifické, všeobecně použitelné míchané reaktory, které jsou snadno dostupné v různých velikostech a jsou levné. Jsou známy i reaktory s vloženým filtračním dnem a míchané mechanicky míchadly různých konstrukcí. Obecným nedostatkem mechanicky míchaných reaktorů je destruktivní vliv míchadla (střížný efekt) na zrníčka biokatalyzátoru v míchané suspenzi, kdy dochází dříve nebo později k abrazi povrchu zrníček, jejich rozdrobování, což sice zvyšuje specifickou aktivitu biokatalyzátoru zvýšením celkového povrchu zrníček, ale zároveň po krátké době k vyřazení celé vsádky biokatalyzátoru z možnosti opakovaného použití pro ztrátu filtrabilnosti na vloženém filtračním dně. Použití tvrdších typů biokatalyzátorů odolnějších více k abrazi míchadlem má nepřekonatelnou nevýhodu značně nižší specifické aktivity těchto typů ve srovnání s gelovitou formou biokatalyzátorů.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob enzymových výrob a zařízení k provádění tohoto způsobu za pomoci zrnitých typů biokatalyzátorů podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se výroba provádí za pneumatického míchání reakční směsi bez abrazivního vlivu na zrnka nabobtnalého biokatalyzátoru průchodem tlakového plynu, s výhodou vzduchu nebo dusíku, filtračním členem u dna reaktoru a po skončené enzymatické reakci slouží tento člen k odfiltrování zreagovaného roztoku substrátu od suspenzního biokatalyzátoru. Při šaržovitém způsobu výroby je filtrát přímo dále zpracováván na konečný produkt.

Způsob podle vynálezu a zařízení při kontinuálním postupu výroby spočívá ve využití filtračního členu z větší části jeho filtrační plochy k nepřetržitému průchodu tlakového plynu do reakční směsi, a tím k jejich nepřetržitému pneumatickému bezabrazivnímu míchání a zároveň je menší oddělená část filtrační plochy filtračního členu využívána k protisměrnému odtoku ventilem regulovatelného podílu částečně zreagovaného roztoku substrátu, zbaveného průchodem filtračním členem suspenzního biokatalyzátoru, který zůstává v reakčním kotli, do napojeného dalšího reaktoru. Podíl filtrátu tekoucího do napojeného druhého reaktoru odpovídá svým objemem trvalému nátoku roztoku substrátu do prvního reaktoru. Druhý reaktor je vybaven stejně jako první a pracuje obdobně. Výtok z druhého reaktoru je zpracováván přímo na konečný produkt. Podle povahy enzymové reakce a její rychlosti může být sestavena kaskáda větších reaktorů.

Zařízení podle vynálezu je s výhodou vybaveno filtračním členem ve formě multiporezní kovové desky nebo hruběji děrované kovové desky kryté síťovinou o celém průřezu dna reakčního kotle a vstupující tlakový plyn pro pneumatické míchání prochází filtračním členem, když byl předem rozptýlen na celou spodní plochu filtračního členu pomocí rozptylovacího děrovaného potrubí ve tvaru věnce.

Vhodný filtrační element může mít různé formy a materiálové složení. Osvědčilo se například řešení pomocí vloženého falešného filtračního dna o rozměru celého průřezu reakčního kotle a toto dno je tvořeno vyztuženou deskou z nerezových vlisovaných (sintrovaných) drátů s průměrnou velikostí pórů. Nerezová porézní vložka může být nahrazena upnutou hustou filtrační pláchetkou z monofilní tkaniny, popřípadě funkcí

filtračního členu mohou zastávat filtrační svíčky.

Způsob podle vynálezu se provádí tak, že pomocí biokatalyzátorů zrnitého filtračního typu probíhá příslušná enzymová reakce za eventuální úpravy pH k přeměně daného substrátu na žádaný produkt v reaktoru uzpůsobeném pro intenzivní pneumatické bez abrazivního působení na zrnka nabobtnaného biokatalyzátoru míchání pomocí tlakového plynu vstupujícího do reaktoru filtračním členem. Po skončení enzymové reakce je, po přerušení pneumatického míchání, reakční směs sfiltrována přes tento filtrační člen a s biokatalyzátorem, zůstávajícím v reaktoru je po přidání nového roztoku substrátu nasazena opakovaně nová šarže enzymového procesu výroby. Při kontinuálním způsobu výroby je v kaskádě napojených nejméně dvou reaktorů pneumaticky míchán plynem vstupujícím přes filtrační člen roztok substrátu kontinuálně natékající do prvního reaktoru. Filtrát reakční suspenze po vhodné průměrné době prodlevy v reaktoru vytéká kontinuálně za stálého pneumatického míchání reakční směsí oddělenou částí filtračního členu do nálevkovitého sběrného členu na spodní straně filtračního členu a odtud za regulace výtakovým ventilem do druhého reaktoru, naplněného také zrnitým biokatalyzátorem. Zde enzymatický proces započatý v prvním reaktoru pokračuje za obdobných podmínek pneumatického míchání, regulovaného množstvím plynu procházejícím filtračním členem u druhého reaktoru. V případě, že enzymová reakce je závislá na úpravě pH, je toto měřeno pH elektrodami a automaticky regulováno přidávkou reakčních činidel. V druhém napojeném reaktoru je enzymový proces buď doveden do konce když průměrná doba prodlevy roztoku substrátu v reaktoru odpovídá době potřebné k dokončení reakce, nebo část filtrátu reakční směsí ještě neúplně zreagované vytéká nepřetržitě způsobem popsaným u prvního reaktoru kontrolovaně do dalších reaktorů stejného typu. U posledního reaktoru vytéká konečně nepřetržitě filtrát reakční kapaliny opět způsobem popsaným u prvního reaktoru rychlostí, která se rovná rychlosti nátoky substrátu do prvního roztoku a je veden na zpracování na konečný produkt.

Na připojených výkresech je znázorněno zařízení podle vynálezu, kde na obr. 1 je znázorněno zařízení pro šaržovitý způsob výroby za pneumatického míchání s volně odcházejícím plynem, na obr. 2 je schematicky znázorněno zařízení pro šaržovitý způsob výroby s recirkulací plynu pro pneumatické míchání a na obr. 3 je znázorněno zařízení pro nepřetržitý způsob výroby v kaskádě nejméně dvou pneumaticky míchaných reaktorů na sebe napojených s volným odchodem míchaného plynu.

Zařízení podle vynálezu pro šaržovitý způsob výroby je tvořeno podle obrázku 1 otevřeným duplikátorovým reaktorem 1 s filtračním členem 2, rozptylovacím členem 3, výpustním ventilem 4 a pH elektrodou 5.

Zařízení podle vynálezu pro šaržovitý způsob výroby při pneumatickém recirkulujícím plynem je tvořeno podle schematického obrázku 2 tlakovým nebo uzavřeným reaktorem 5, filtračním členem 6, rozptylovacím členem 7, výpustním ventilem 8, výpustným ventilem 9, kompresorem 10, spojovacím potrubím 11, pH elektrodou 12.

Zařízení podle vynálezu pro nepřetržitý způsob výroby je podle obrázku 3 tvořeno nejméně dvěma reaktory 12 a 18 s filtračními členy 13 a 19, rozptylovacími členy 14 a 20, sběrnými členy výtoku 15 a 21, nátokovým potrubím 16 a napojovacím potrubím 17 u prvního reaktoru, výtakovým potrubím 22 u druhého reaktoru a pH elektrodami 23 a 24 u obou reaktorů.

Způsob podle vynálezu a zařízení k provádění tohoto postupu výhodně využívá zvláště vysoce nabobtnalé, ale k abrazi málo resistantní typy zrnitých biokatalyzátorů s vysokou specifickou aktivitou pro enzymové výroby, které zvláště vyžadují intenzivní, ale při tom šetrné míchání reakční suspenze, čehož je zde dosaženo pneumatickým celoprostorovým způsobem míchání.

Způsob podle vynálezu a zařízení k provádění tohoto postupu pro nepřetržitý

výrobní postup umožňuje dosahovat na konstrukčně jednoduchém a levném zařízení vysoké produktivity za ustálených a tedy snadno regulovatelných parametrů procesu, což umožňuje plnou robotizaci procesu výroby. Uspoří se nasazovací a sklízecí ztrátové doby při porovnání se šaržovitým způsobem výroby, umožní se zvýšit koncentraci biokatalyzátoru v násadě, aniž by se zvýšila zádrž filtrátu ve filtračním koláči biokatalyzátoru, a tím se podstatně urychlí enzymatický proces.

Eliminace mechanického míchadla a působení jeho střižných sil u pneumaticky míchaného reaktoru vede při nasazení stejné váhové koncentrace biokatalyzátoru u vysoce nabobtnalých měkkých biokatalyzátorů se specifickou aktivitou o 30 až 50 % vyšší k urychlení enzymové reakce o desítky procent reakčního času, což se zvláště projeví u enzymových procesů, kde jak substrát, tak produkt reakce je chemicky nestabilní, například roztok penicilinu při enzymovém štěpení na 6-aminopenicilánovou kyselinu.

Způsob výroby a zařízení podle vynálezu jsou objasněny v následujících příkladech provedení, které vynález dokládají, aniž by jej omezovaly.

Příklad 1

Popis reaktoru: Nerezový, duplikátorový, tlakový (0,2 MPa přetlaku) reaktor o pracovním objemu 150 litrů a celkovém objemu 225 litrů při poměru průměru ku celkové výšce 1 : 3, dělený se odnímatelným dnem na přírubách. Mezi přírubami je sevřeno falešné děrované dno z nerezové 4 mm desky s kulatými 1 cm otvory po celé ploše vnitřního průměru kotle, pokryté dvěma sítý drženými také sevřením přírub a okrajovým těsněním. Spodní distanční síť je vytvořeno z 0,8 mm nerezových drátů s velikostí ok 3 mm a je pokryto jemnějším filtračním nerezovým sítím s rozměrem ok 75 mikronů. Pod tento filtrační člen je vyvedena stěnou dna reaktoru trubka, zakončená děrovaným kruhovým věncem pro přívod míchacího plynu. Reaktor temperovaný teplou vodou v plášti na teplotu reakční směsi 37 °C je ve válcovité části opatřen skleněnou pH elektrodou zasahující do bublaného obsahu reaktoru.

Jako míchací plyn byl použit dusík, který pro první náplň reaktoru byl vpuštěn do systému z tlakové bomby, procházel zespoda filtračním členem v objemu 50 litrů/min., promíchával reakční směs a vracel se výpustním ventilem ve víku reaktoru do potrubí vedoucího k nasávacímu konci cirkulačního kompresoru a z něho znovu do reaktoru do věnce pod filtračním členem.

Do reakčního kotle byl předem vnesen jednorázově biokatalyzátor imobilizovaných kvasinek zrnitého typu s penicilinamidázovou aktivitou připravený postupem podle čs. autorského osvědčení č. 231 458, přičemž částice byly zpevněny postupem podle čs. autorského osvědčení č. 259 997 v silně nabobtnalém stavu o specifické aktivitě 60 jednotek (U)/g sušiny. Množství vneseného biokatalyzátoru činilo 30 kg vlhké hmoty v sušině 30 %.

Poté bylo do reakčního kotle přivedeno 90 litrů demineralizované vody teplé ± 1 °C a směs pneumaticky míchána.

V dalším postupu přidáno do reakčního kotle 7,5 kg surové draselné sole penicilinu V ve formě 60% roztoku v destilované vodě. Tento roztok byl během 24 hodin skladován v zásobním množství v uzavřeném smaltovaném zásobníku a byl udržován na teplotě 0 až 3 °C.

Byla zapojena termoregulace reakční směsi médiem v plášti reaktoru na výslednou teplotu 37 °C ± 1 °C.

Potom byla reakční směs v kotli doplněna demineralizovanou vodou (39 °C) na celkový objem 150 l. Vzniklá reakční směs obsahovala 5ti procentní koncentraci surové dra-

solné soli penicilinu V a vlivem okamžitého zahájení enzymové reakce docházelo k posunu pH pod počáteční hodnotu a zapojená automatická regulace přívodu čpavkové vody do reaktoru počala upravovat pH suspenze na požadovanou hodnotu $8,0 \pm 0,1$.

Za uvedených parametrů procesu řízeného automatem enzymová reakce samovolně pokračovala po dobu 105 minut, během nichž počáteční rychlá spotřeba alkálie nutná k regulaci pH se zpomalovala a ke konci zcela ustala, což je jedním z indikátorů ukončení enzymové reakce.

Po uvedené době byl uzavřen odchod míchacího plynu a tlak v kotli zvýšen až na 0,2 MPa. Přívod plynu do reaktoru uzavřen a otevřen odtok z reaktoru do vakuového zásobníku. Reakční směs v kotli byla přes filtrační člen odfiltrována pomocí přetlaku za 6 minut a filtrát jímán ve vakuovém zásobníku za současného chlazení zásobníku na teplotu kolem 5 °C. Stupeň enzymové konverze V-penicilinu na 6-APK činil 99,7 % teorie a stopy rozkladných produktů.

Popsaný proces enzymové hydrolýzy byl opakován za stejných parametrů s výjimkou toho, že nebyl vnášen žádný nový biokatalyzátor, ale systém pracoval opakovaně s odfiltrovaným biokatalyzátorem z jeho předchozí násady, která zůstává trvale v reaktoru. Operace byly opakovány celkem 84 krát v pracovních cyklech trvajících 120 minut včetně časových prodlev mezi jednotlivými cykly.

Jednotlivé šarže konverzních směsí byly čereny postupem podle čs. autorského osvědčení č. 218 182 ve vakuovém zásobníku úpravou pH v přítomnosti flokulantů a následnou filtrací přes celulozové filtrační vložky. Čiré filtráty byly podrobeny krystalizaci v přítomnosti 2 násobného objemu butylacetátu k objemu zpracovávané vodné fáze úpravou pH na hodnotu 4,2 zředěnou kyselinou sírovou (30%). Po krystalizaci byl produkt oddělen na centrifuze, promyt ledovou destilovanou vodou, suspendován v acetonu, znovu odseparován a usušen. 6-APK měla v průměru čistotu 99,1 % a průměrný výtěžek ze všech šarží činil v průměru 84,1 % teorie. Celkem tak bylo vyrobeno za 7 dní 307,2 kg 6-APK. Sedi- mentační rychlost a filtrabilita biokatalyzátoru stejně tak jako jeho specifická akti- vita se nezměnila.

Příklad 2

Použitá zařízení: Stejně jak uvedeno v příkladu 1, s tím rozdílem, že jako mícha- cího plynu bylo namísto dusíku použito tlakového vzduchu, který nebyl cirkulován, od- cházel volně výpustním ventilem ve víku reaktoru do atmosféry a reaktor v tomto přípa- dě pracoval beztlakově jako otevřený reaktor. Způsob provedení enzymové reakce byl za- chován obdobný jako v příkladě 1 se stejnými opakoványi násadami.

Při vyhodnocení celého procesu při opakování stejného počtu uzavřených cyklů bylo dosaženo stejných výtěžků v rámci statisticky nevýznamných úchylek.

Příklad 3

Použitá zařízení sestávalo ze tří nerezových duplikátorových reaktorů o pracovním objemu 150 litrů. Reaktory byly ve spodní části dělené na přírubu a dno spodního dílu tvořil velmi plochý kužel. Mezi kuželové dno a válcový trup reaktoru byl sevřen filtrač- ní člen tvořený vyztuženou deskou z mutiporézního nerezového materiálu o průměrné veli- kosti pórů 75 μm. Pod filtrační člen byl vyveden přívod tlakového vzduchu do děrovaného věnce. Na spodní plochu filtračního členu byl centrálně lehce bodovým svářením přichy- cen sběrný člen filtrátu ve formě nerezové nálevky o průměru 12 cm, která svou trubko- vitou výpustní částí byla vyvedena středem dna reaktoru do následně napojeného dalšího

reaktoru. Do všech tří reaktorů byl přiváděn samostatně tlakový vzduch v objemu 50 litrů za minutu a podle povelů automatické regulace pH příslušné ke každému reaktoru dávky čpavkové vody, k udržování pH $8,0 \pm 0,1$. Do prvního reaktoru byl kontinuálně přiváděn dávkovacím čerpadlem roztok substrátu podle požadavku průtokové rychlosti experimentálně vyvážené. Kontinuální výtoky filtrátů ze všech 3 reaktorů, které prošly filtračními členy byly regulovány ventily na výtocích v přímé závislosti na nátoku do prvního členu, takže plnění všech reaktorů zůstávalo konstantní. Pracovní teplota reaktorů 37°C byla udržována teplou vodou v plášti válcovitých částí reaktorů. Ostatní příslušenství kontinuálně pracující linky bylo obdobou příslušenství aparatury uvedené v příkladu 1.

Do každého ze 3 reaktorů bylo vneseno 30 kg vlhké hmoty zrnitého biokatalyzátoru immobilizovaných bakterií se specifickou aktivitou 80 jednotek (U) G-penicilinamidázy/g připraveného podle čs. autorského osvědčení č. 231 458, přičemž částice byly zpevněny postupem podle čs. autorského osvědčení č. 241 730. Do prvního reaktoru v sérii byl přiváděn 6% roztok draselné soli deacetoxycefalosporinu G připravovaný kontinuálně mísením koncentrovaného chladného roztoku deacetoxycefalosporinu s teplou demineralizovanou vodou bezprostředně před vstupem do reaktoru s výslednou teplotou $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ při průtočné rychlosti 7,5 litrů za minutu. Zapnuto pneumatické míchání vzduchem, automatická regulace pH a termoregulace. Postupně naplněn první reaktor na pracovní objem 150 l a otevřeno spojení s druhým reaktorem v sérii. Přetlak dusíku a uzavírací orgán mezi reaktory byly nastaveny na průtok 7,5 l filtrátu za minutu z prvního do druhého reaktoru. Obdobně nastavený výtok z druhého reaktoru do třetího v sérii a výtok z třetího do zpracovatelského úseku celkové aparatury.

Filtrát z třetího reaktoru byl průtočně chlazen, jímán do míchaného nerezového kotle, kde byl vychlazen na teplotu 0 až 3°C . Vsádkové čerání roztoku bylo prováděno úpravou pH, flokulací a filtrací (0,05% Sdipuru CL-930, pH 6,8, stání během flokulace 15 minut, filtrace přes celulózové filtrační vložky (postupem podle čs. autorského osvědčení č. 218 182. Čirý vychlazený filtrát natékal do smaltovaného extrakčního kotle, kde byl dále zpracován postupem podle čs. autorského osvědčení č. 218 023 takto: K filtrátu byl přičerpán petroléter v objemu 1 : 1 a směs za chladu 0 až 3°C stále míchána. pH směsi postupně upraveno 30% kyselinou sírovou na hodnotu izoelektrického bodu 7-ADCK ($4,2 \pm 0,05$) a krystalizace 7-ADCK dokončena za míchání směsi po dobu 20 minut. Po zastavení míchání těžká vodná fáze vypouštěna na bubnovou centrifugu, lehká organická fáze obsahující fenylactovou kyselinu byla odvedena k regeneraci. Krystaly promyty v centrifuze ledovou destilovanou vodou, vyjmuty z odstředivky a suspendovány v acetonu, znovu odseparovány a krátce promyty studeným acetonem.

Kontinuální proces enzymové hydrolýzy desacetoxycefalosporinu-G a diskontinuální proces izolace 7-ADCK pokračoval po ustálení uvedených regulačních parametrů po dobu 48 hodin, přičemž za tuto dobu bylo zpracováno celkem 21.600 litrů roztoku substrátu a získáno celkem 621,8 kg 7-ADCK s průměrným obsahem 98,61 % čisté bezvodé substance.

Po uvedené době provozu se specifická aktivita biokatalyzátoru, stejně jako jeho filtrabilita a sedimentační rychlost částic nezměnila.

Příklad 4

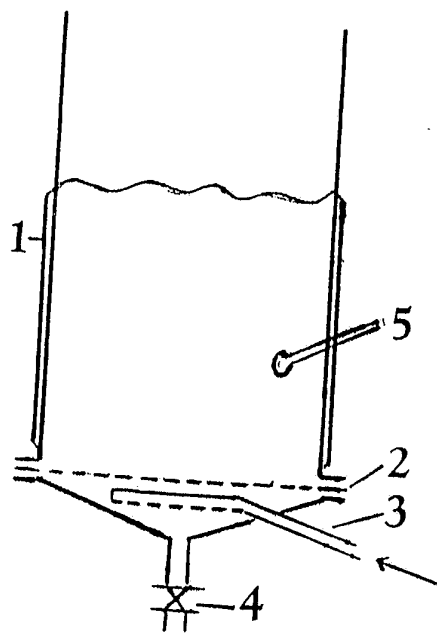
Bylo použito zařízení a pracovní postup, jak uvedeno v příkladu 1 s tím, že do reakčního kotle byl vnesen jednorázově biokatalyzátor immobilizovaných bakterií zrnitého typu se specifickou aktivitou 80 jednotek (U) G-penicilinamidázy na gram sušiny o celkové hmotnosti 40 kg vlhké hmoty a sušině 30 %. Dále postupováno podle příkladu 1 s tím, že celkové množství surové draselné sole penicilinu-G přivedené do reaktoru ve formě roztoku obnášelo 9 kg a koncentrace substrátu v reakční směsi byla 6%.

Za parametrů procesu řízeného automatem, jak uvedeno v příkladu 1 hydrolýza skončila po 75 minutách. Při zpracování reakční směsi na krystalickou 6-APK použit postup podle příkladu 1. Popsaný proces enzymové hydrolýzy byl opakován za stejných podmínek s tím, že již nebyl vnášen žádný nový biokatalyzátor, ale systém pracoval opakovaně s původní násadou biokatalyzátoru, která po filtraci zůstávala trvale v kotli. Uvedeným postupem bylo zpracováno celkem 64 jednotlivých násad enzymové hydrolýzy a připraveno tak celkem 274,1 kg 6-APK o průměrné čistotě jednotlivých šarží 98,8 %. Sedimentační rychlost a filtrabilita biokatalyzátoru, stejně jako jeho specifická aktivita se nezměnila.

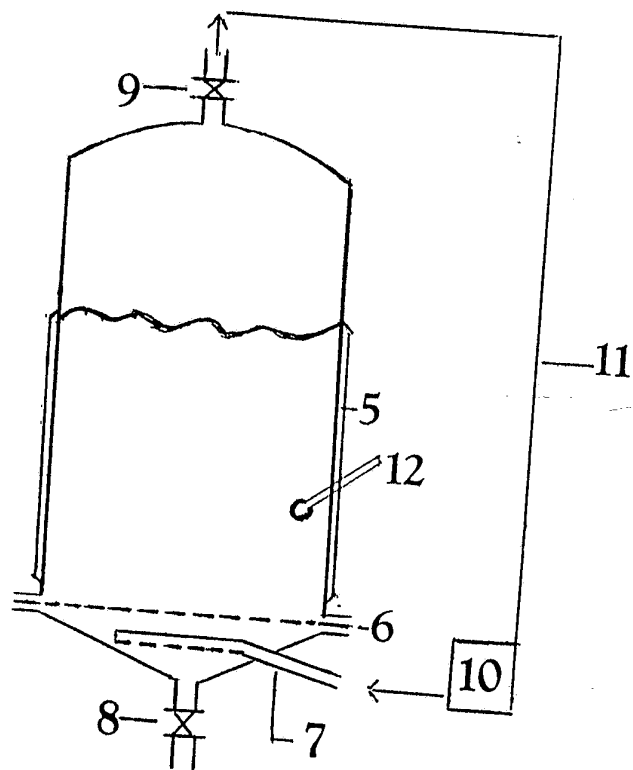
PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob enzymových výrob za pomoci zrnitých typů biokatalyzátorů vsádkově nebo kontinuálně, vyznačující se tím, že za stálé regulace teploty a pH se pneumaticky míchá suspenze substrátu a zrnitého biokatalyzátoru průchodem tlakového plynu dvousměrně a po dosažení žádoucího stupně enzymové přeměny se u vsádkového postupu pneumatického míchání přerušuje, reakční směs se sfiltruje, přičemž biokatalyzátor zůstává a filtrát vytéká k dalšímu zpracování na konečný produkt.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že míchací plyn je vzduch nebo dusík, který je recirkulován.
3. Zařízení k provádění způsobu podle bodu 1 vsádkovým postupem, vyznačující se tím, že se skládá z opláštěného reaktoru (1), na jehož dně je filtrační člen (2), rozptylovací člen (3), výpustní ventil (4) a pH elektrody v pracovní části reaktoru (5).
4. Zařízení k provádění způsobu podle bodu 1 vsádkovým způsobem, vyznačující se tím, že se skládá z tlakového nebo uzavřeného opláštěvaného reaktoru (5), na jehož dně je filtrační člen (6), rozptylovací člen (7), výpustní ventil (8), na víku výpustní ventil (9) napojený na cirkulační kompresor (10) spojovacím potrubím (11) a z pH elektrody ve válcovité stěně reaktoru.
5. Zařízení k provádění způsobu podle bodu 1 nepřetržitým postupem, vyznačující se tím, že se skládá z nejméně dvou propojených opláštěvaných reaktorů (12 a 18), na jejichž dně je vždy filtrační člen (13 a 19), rozptylovací člen (14 a 20), na spodní ploše filtračního členu jsou napojeny sběrné členy (15 a 21), přičemž do prvního reaktoru (12) v sérii ústí nátokové potrubí (16) a vychází napojovací potrubí (17), na dně druhého reaktoru výtokové potrubí (22) a oba reaktory jsou vybaveny pH elektrodami (23 a 34).

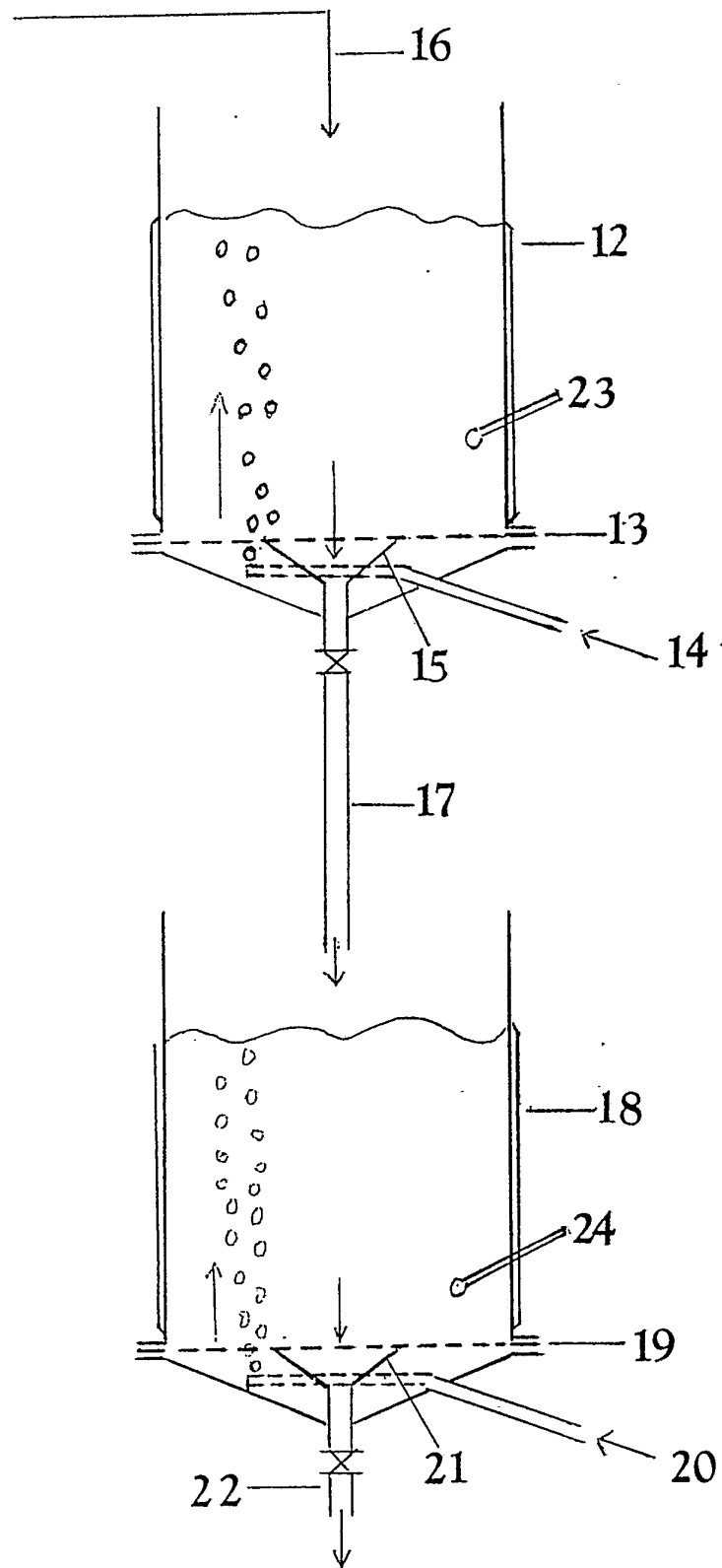
2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3