



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

218023
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 P 35/00

(22) Přihlášeno 07 09 81
(21) (PV 6586-81)

(40) Zveřejněno 28 05 82

(45) Vydáno 15 02 85

(75)
Autor vynálezu

MACHOVÁ JARMILA dr., ROZTOKY u Prahy,
VOJTÍŠEK VLADIMÍR dr. CSc., NOVÁK LUDVÍK dr. CSc.,
ČULÍK KAREL dr., PRAHA

(54) Způsob enzymové výroby kyseliny 7-aminodesacetoxycefalosporanové

1

Vynález se týká způsobu enzymové výroby a izolace kyseliny 7-aminodesacetoxycefalosporanové z desacetoxycefalosporinu pomocí speciálně vyvinutých, imobilizovaných, buněčných katalyzátorů na bázi zesítěné a permeabilizované biomasy, buněčných agregátů, nebo na bázi navzájem chemicky vázaných mikrobiálních buněk obsahujících enzym penicilinacylázu.

Získaná kyselina 7-aminodesacetoxycefalosporanová slouží jako základní meziprodukt pro výrobu polosyntetických desacetoxycefalosporinů, zejména cefalexinu.

2

Vynález se týká způsobu enzymové výroby 7-aminodesacetoxycefalosporanové kyseliny (dále jen 7-ADCK) z N-fenylacetamido-desacetoxycefalosporinu (dále jen DAOC-G) zesíťenými, agregovanými nebo vázanými buňkami s penicilinacylázovou aktivitou.

7-ADCK je klíčovým meziproduktem syntézy alfa-aminocefalosporinových antibiotik typu cefradinu, zejména však cefalexinu, to jest monohydrátu kyseliny D-(—)-(alfa-amino-alfa-fenylacetamido)-3-methyl-3-cefem-4-karboxylové, který je vysoce účinný, komerčně vyráběným antibiotikem proti některým patogenním grampozitivním a gramnegativním mikroorganismům, zahrnuje v to i kmeny necitlivé na přirozené a polosyntetické peniciliny.

7-ADCK lze připravit řadou způsobů, z nichž z průmyslového hlediska nejvýznamnější jsou dva způsoby. První způsob vychází z draselné soli benzylpenicilinu (penicilinu G) nebo fenoxymetylpenicilinu (penicilinu V), jejichž karboxylové skupiny se přechodně chrání tvorbou snadno zmydelnitelných esterů, např. p-nitrobenzylesteru, 2,2,2-trichlorethylesteru nebo benzylhydriesteru. Ty se v dalším stupni převádějí oxidací v příslušné sulfoxid-estery, které se Pummererovým přesmykem mění z penamových struktur v cefemové, to jest v estery desacetoxycefalosporinů G či V. V dalším reakčním stupni je zapotřebí odstranit nežádoucí postranní řetězec za vzniku 7-ADCK se stále ještě chráněnou karboxylovou skupinou.

Chránicí skupiny se odstraní a volná 7-ADCK se pak acyluje za vzniku cefalexinu, s výhodou např. podle čs. autorského osvědčení č. 177 703. Odstranění nežádoucího postranního řetězce u tohoto způsobu se provádí výlučně chemickým způsobem; sulfoxidy benzylpenicilinu nebo fenoxymetylpenicilinu s chráněnou karboxylovou skupinou se uvádějí do reakce s činidly typu chloridu fosforečného, intermediárně vzniká chloriminový derivát, který je alkoholózou převáděn v příslušný iminoderivát, následná hydrolyza vede k příslušným esterům 7-ADCK (F. Huber et al., In: Cephalosporin and Penicillin Compounds, Their Chemistry and Biology, ed. E. H. Flynn, pp. 27—73, Academic Press, New York, 1973).

Chemická hydrolyza probíhá sice s dobrým výtěžkem, představuje však sled velice nepříjemných operací, použití velmi agresivních chemikálií, atakujících použité aparatury.

Druhý způsob výroby 7-ADCK je co do počtu technologických operací kratší a z ekonomického hlediska výhodnější. Fenoxymetylpenicilin (penicilin V), zejména však benzylpenicilin (penicilin G) se převádí nejprve v příslušný sulfoxid s nechráněnou karboxylovou skupinou, s výhodou postupy podle čs. autorského osvědčení č. 221 161 a č. 210 739. V dalším stupni se provádí Pu-

mmererův přesmyk za vzniku desacetoxycefalosporinu G.

Z uvedeného vyplývá, že druhý způsob přípravy desacetoxycefalosporinů přináší četné výhody a je proto dnes využíván většinou výrobci polosyntetických cefalosporinů. Tím, že zcela eliminuje používání chránicích skupin a jejich následné odstraňování, je podstatně kratší. I v tomto druhém, ekonomicky výhodném způsobu výroby 7-ADCK, zůstává problém odstranění nežádoucího postranního řetězce. Chemický způsob, podobně jako u prvního způsobu, používá agresivního, snadno se hydrolyzujícího chloridu fosforečného a má-li se docílit vysokého výtěžku, je nezbytné pracovat za nízkých teplot; při výrobě ve větším měřítku je třeba zpracovávat i mimořádně toxické odpadní louhy. Chemický způsob odstraňování postranního řetězce (desacetylace) nepředstavuje tedy ani v jednom z obou uvedených způsobů výhodné řešení problému.

V odborné a patentové literatuře je rovněž popsán způsob enzymové desacetylce postranního řetězce desacetoxycefalosporinů, zejména desacetoxycefalosporinu G, enzymem penicilinacylázou, produkovanou různými mikroorganismy, zejména *Bacillus megatherium*, např. podle NDR patentového spisu č. 97 213, a nativními (živými) buňkami *Escherichia coli*, popřípadě rozpustnou penicilinacylázou izolovanou z těchto buněk podle čs. AO č. 190 459. Zmíněný enzymový způsob desacetylce postranních řetězců desacetoxycefalosporinů je sice selektivní, vylučuje řadu zmíněných technologických a z části i ekonomických potíží ve srovnání s chemickou hydrolyzou (eliminace agresivních chemikálií), avšak vede ke vzniku produktů 7-ADCK silně znečištěných bílkovinnými příměsemi plynoucími z autolyzovaných buněk, popřípadě z enzymových a balastních bílkovin, což vede k izolačním ztrátám při dalším čištění, popřípadě k nebezpečí vzniku alergických reakcí při aplikaci polosyntetických desacetoxycefalosporinů, vyrobených z takto získané 7-ADCK v klinické praxi.

Další nevýhodou tohoto postupu je, že nativní (živé) buňky, nebo rozpustný enzym z nich izolovaný, lze pro enzymovou reakci použít pouze jednorázově, což ve svých důsledcích znamená nevýhodnou ekonomickou bilanci ve srovnání s chemickou hydrolyzou, neboť pro každou výrobní šarži je třeba vykultivovat enzymově aktivní biomasu ve velkokapacitním fermentoru pro jednorázové použití. Při eventuální aplikaci rozpustného enzymu, použitého být pouze v technické formě, náklady na izolaci enzymu z buněk mikrobiálního producenta vzrostou natolik, že aplikace takovéto technologie je ekonomicky nereálná.

Ve snaze o ekonomizaci procesu enzymové desacetylce postranních řetězců kyseliny 7-fenylacetamidodesacetoxycefalospo-

ranové vyrobené z benzylpenicilinu a kyseliny 7-fenoxyacetamidodesacetoxycefalosporanové vyrobené z fenoxymetylpenicilinu a k odstranění zmíněných nežádoucích vlivů, byly vyvinuty různé formy, především různým způsobem imobilizovaných preparátů enzymu penicilinacylázy, izolované z buněk *Escherichia coli*, *Bacillus megatherium*, *Proteus rettgeri* a *Erwinia aroidea*, umožňující další ekonomizaci procesu přípravy 7-ADCK, spočívající především ve vícenásobném vsádkovém nebo kontinuálním využití imobilizovaných forem tohoto enzymu [B. J. Abbott, In: *Advances Applied Microbiology*, ed. D. Perlman, Vol. 20, pp. 203—257, Academic Press, New York, San Francisco, London, 1976]. Jedná se především o práce japonských autorů (britský patentový spis č. 1 324 159), kteří izolovanou penicilinacylázu z *Bacillus megatherium* sorbovali na křemelinu, aktivní uhlí, karboxymethylcelulózu, nebo různé iontoměnné pryskyřice, a takto fyzikálně, resp. fyzikálně-chemicky imobilizovaného enzymu použili pro přípravu 7-ADCK. Rovněž italští autoři (čs. patentový spis č. 190 469 fyzikálně zabudovali izolovanou penicilinacylázu z buněk *Escherichia coli* do vláken triacetátu celulózy a tohoto preparátu použili jak pro enzymovou přípravu 7-ADCK z DAOC—G, tak pro enzymovou acylaci 7-ADCK methylesterem D-(—)-fenylglycinu za vzniku cefalexinu. Posléze zmíněná metoda imobilizace penicilinacylázy do vláken triacetátu celulózy, enzym byl však izolován z jiného druhu mikroorganismu (NSR patentový spis č. 2 422 374), byl využit pro přípravu 7-ADCK při použití kyseliny 7-fenoxyacetamidodesacetoxycefalosporanové či jejich solí jako substrátu. Naznačeným způsobem získané imobilizované formy penicilinacylázy, lze použít pro přípravu 7-ADCK opakovaně, biologické a ostatní toxické příměsi v produktu a tím v klinických formách polosyntetických desacetoxycefalosporinů jsou zanedbatelné a celý proces ekonomie je řízen především náklady na katalyzátor, tj. náklady na kultivaci enzymově aktivní biomasy a především na výtěžek v izolaci enzymu a výtěžek jeho imobilizace. Je pochopitelné, že v ekonomii celého procesu je limitujícím faktorem zejména výtěžnost izolace enzymu a cena a dostupnost nosičů pro vazbu enzymu a výtěžek imobilizace, včetně operačního (pracovního) poločasu imobilizovaného enzymu, tj. v praxi hodnota, kolikrát, resp. jak dlouho lze katalyzátor opakovaně nebo kontinuálně využívat bez významné ztráty jeho specifické enzymové účinnosti. V neposlední řadě hraje významnou roli při použití imobilizovaných enzymů účinnost a stupeň enzymové konverze substrátu na produkt, výtěžek v izolaci a kvalita produktu.

Byla vyvinuta řada technologií výroby biokatalyzátorů s penicilinacyláзовou aktivitou určených především pro účely enzymo-

vé výroby 6-aminopenicilanové kyseliny (dále jen 6-APK) enzymovou hydrolýzou penicilinu, zejména benzylpenicilinu. Jedná se především o imobilizované materiály s penicilinacyláзовou aktivitou na principu chemicky imobilizovaných buněk *Escherichia coli* a dalších mikroorganismů, a to jednak zesíťovaných a permeabilizovaných buněk produkčního mikroorganismu, umožňující opakované použití tohoto materiálu pro semikontinuální výrobu 6-APK, jejich výroba a použití pro uvedený účel je předmětem čs. autorského osvědčení č. 201 621, jednak mikrobiálních buněčných agregátů s penicilinacyláзовou aktivitou, jejichž výroba je předmětem čs. autorského osvědčení č. 197 101, dále výroba navzájem chemicky vázaných buněk s penicilinacyláзовou aktivitou podle čs. autorského osvědčení č. 203 607, a konečně výroba navzájem chemicky vázaných buněk prokaryontních a eukaryontních mikroorganismů s různými enzymovými aktivitami, mimo jiné i s aktivitou penicilinacyláзовou, podle čs. autorského osvědčení č. 209 265.

Citované postupy výroby těchto biokatalyzátorů nevyužívají izolace enzymu z buněk mikrobiálního producenta a jeho následné vazby na nosič, nýbrž využívají buňku producenta jako přirozený nosič aktivity enzymu a původními postupy imobilizace pouze enzym chemicky (kovalentní vazbou) fixují uvnitř produkčních buněk, případně takto chemicky „konzervované“ buňky, odolné vůči autolýze, další chemickou reakcí spojují navzájem bez použití jakéhokoliv ve vodě nerozpustného nosiče s cílem zdokonalení sedimentačních vlastností vzniklých částic, které tvoří integrální jednotky s vysokou penicilinacyláзовou aktivitou.

Vlastnosti zmíněných buněčných biokatalyzátorů, specifická aktivita, enzymová účinnost, mechanická a enzymová stabilita částic a další biochemické, fyzikálně-chemické a fyzikální vlastnosti těchto materiálů, dovolují mnohonásobně opakované (diskontinuální) nebo kontinuální použití pro účely výroby 6-APK. Z ekonomického hlediska pak náklady na výrobu zmíněných typů biokatalyzátorů jsou minimální, neboť technologie jejich výroby nevyžaduje žádný komerční nosič, zahrnuje malý počet operací, surovinové náklady na jejich výrobu jsou minimální.

Zjistili jsme nyní, že za selektivních reakčních podmínek vedení biochemické reakce lze s výhodou zmíněné imobilizované buněčné materiály využít pro předmětný způsob výroby 7-ADCK z desacetoxycefalosporinů, zejména z DAOC—G, a to jak mnohonásobně opakovaně (diskontinuálně nebo semikontinuálně), tak kontinuálně, při vysoké účinnosti enzymové konverze substrátu na produkt (95—100% teorie), vysoké výtěžnosti v izolaci produktu (molární výtěžek v izolaci až 90% teorie) a vysoké kvalitě (minimální obsah účinné látky pro-

duktu 95% teorie]. Ve spojení se zjednodušenými a ekonomizovanými chemickými postupy výroby desacetoxycfalosporinu G, které jsou předmětem čs. autorských osvědčení č. 209 641, č. 210 739, představuje předmětný způsob enzymové výroby 7-ADCK podle vynálezu komplexní, moderní a ekonomicky reálnou chemicko-enzymovou technologií výroby tohoto farmaceuticky důležitého meziprojektu, umožňující následnou výrobu polosyntetických desacetoxycfalosporinů, zejména cefalexinu.

Způsob enzymové výroby 7-ADCK podle předmětného vynálezu je vyznačen tím, že se vodný roztok desacetoxycfalosporinů G, s výhodou jeho solí o koncentraci 0,05–10,0 proc. hmota/objem, s výhodou 6 % hmota/objem, s hodnotou pH 7,0–8,5, s výhodou 7,8, uvádí při teplotě 10–45 °C, s výhodou 37 °C, diskontinuálně, semikontinuálně nebo kontinuálně ve styk s biokatalyzátorem na bázi zesítně a permeabilizované biomasy mikrobiálních producentů penicilinacylázy nebo na bázi agregovaných nebo navzájem chemicky vázaných buněk producenta tohoto enzymu, načež se po ukončené enzymové konverzi ze supernatantu, popřípadě z matečného louhu po úpravě pH a teploty, izoluje kyselina 7-aminodesacetoxycfalosporanová.

Způsob enzymové výroby podle předmětného vynálezu je dále vyznačen tím, že izolace 7-ADCK se provádí v rozmezí teplot –1 až +15 °C, v rozmezí hodnot pH 3,5 až 5,0, s výhodou +2 °C a pH 4,2, popřípadě v přítomnosti s vodou nemísitelných organických rozpouštědel, zejména benzínu nebo petroletheru a/nebo se vykrytalizovaný produkt suspenduje v rozpouštědlech mísitelných s vodou, zejména v etanolu či acetonu, nebo se oba způsoby kombinují.

Způsoby výroby podle vynálezu jsou dále doloženy v příkladech provedení, aniž by se jimi omezovaly.

Příklady provedení.

Příklad 1

Chemicky vázané mikrobiální buňky s penicilinacylázovou aktivitou vyrobené podle čs. autorského osvědčení č. 203 607 o parametrech: specifická aktivita 6,5 j./mg vlhké hmoty materiálu, průměrné distribuci velikosti částic 0,15 až 0,3 mm a průměrném obsahu sušiny v materiálu 35 %, byly v množství 5 g postupně suspendovány v 45 ml vodných roztocích K-soli DAOC-G [průměrný obsah účinné látky 96,92 %] v rozmezí počátečních koncentrací substrátu 1,0 až 10,0 % hmota/objem. Enzymová reakce probíhala při teplotě 37 °C za nepřetržitého míchání a kontinuální úpravy pH 0,1 až 1,0 N vodným roztokem NaOH pomocí pH-statu v rozmezí hodnot pH 7,6 až 7,8.

Po skončení enzymové hydrolýzy, která je indikována zastavením spotřeby alkálie, byly částice biokatalyzátoru odděleny vakuovou filtrací přes terylenovou plachetku a promyty vodou. Čiré roztoky reakčních směsí byly ochlazeny na teplotu +4 °C a za stálého míchání byl přidáván 25% vodný roztok kyseliny sírové za současně potenciometrické kontroly pH na hodnotu 4,2. Po úpravě pH reakčních směsí byly tyto okyselené reakční směsi ponechány v klidu cca 1 hodinu při uvedené teplotě.

Po kvantitativní krystalizaci produktu byly krystaly z jednotlivých reakčních směsí postupně na fritě odděleny vakuovou filtrací a produkty postupně suspendovány v 50 mililitrech vychlazeného etanolu (+10 °C), znovu odděleny filtrací, na fritě ještě promyty přebytkem chladného etanolu a vysušeny do konstantní hmoty. Dosažené parametry enzymové hydrolýzy, výtěžky a kvalita produktu jsou shrnuty jak následuje.

Počáteční koncentrace DAOC-G (v %)	1,0	3,0	6,0	8,0	10,0
reakční doba nutná pro kvantitativní konverzi (min.)	30	45	90	110	180
množství získané 7-ADCK (v g)	0,23	0,68	1,44	1,92	2,26
obsah 7-ADCK v produktu (v %)	96,83	97,7	97,57	92,65	92,24
výtěžek 7-ADCK (% teorie)	85,65	84,85	86,2	85,5	80,8

Promyté odsáté katalyzátory byly popsáným způsobem a za uvedených podmínek použity ještě jedenkrát, přičemž bylo dosaženo stejných výsledků.

Příklad 2

Do 2litrového skleněného reaktoru opatřeného vtavenou porcelánovou fritou S 2 na dně vnitřního prostoru reaktoru a výpustním ventilem uzavírajícím prostor pod fritou a duplikacním zařízením na oběžnou vodní temperaci reakční směsi udržovanou pomocí ultratermostatu, bylo předloženo 900 ml demineralizované vody a za míchání ver-

tikálně umístěným ocelovým kotvovým míchadlem o počtu otáček 60/min., bylo rozpuštěno v předložené vodě 57 g K-soli DAOC-G o obsahu účinné látky 96,92 %. Do reaktoru byla upevněna skleněná pH-elektroda spojená s pH-statem, pH-metrem a dávkovacím zařízením pro kontinuální úpravu pH. Po rozpuštění bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 7,9 jednonormálním roztokem NaOH.

Po vytemperování roztoku na teplotu 37 °C bylo za nepřetržitého míchání přidáno 110 gramů vlhké hmoty biokatalyzátoru, jehož parametry jsou uvedeny v příkladu 1. Pomocí zmíněného automatického zařízení na

kontinuální úpravu pH bylo toto nepřetržitě udržováno na hodnotě 7,8 roztokem 1 N NaOH v průběhu nepřetržitého míchání a teplota po celých 90 min. enzymové reakce. Po této době byla suspenze vakuově odsáta otevřením výpustního ventilu, přičemž vtavená frita mezi dnem vnitřního prostoru reaktoru umožnila kvantitativní oddělení čiré reakční směsi od částic biokatalyzátoru, které setrvaly v reaktoru.

Po odsátí zreagované kapaliny bylo do reaktoru, který obsahoval vlhkou nepromytou odsátou násadu katalyzátoru použitou v předchozím cyklu, opět předloženo 900 ml vody, v které byla předem rozpuštěna K-sůl DAOC-G ve stejné koncentraci jako v cyklu předchozím a celý postup byl opakován 10× se stejnou násadou katalyzátoru.

Po odsátí zreagované kapaliny z každého z cyklů opakované enzymové hydrolýzy, byla tato přelita do chlazené nádoby, v které bylo předem předloženo 330 ml benzínu vychlazeného na +2 °C a kapalina nepřetržitě míchána a chlazená tak, aby výsledná teplota se pohybovala v rozmezí +1 až +5 stupňů Celsia. pH vychlazené, míchané kapaliny sestávající z organické s vodou nemísitelné a vodné fáze bylo upraveno na hodnotu 4,2 způsobem uvedeným v příkladu 1. Po přibližně půlhodinovém míchání po úpravě pH byla krystalizační směs ponechána v klidu při teplotě kolem 4 °C přibližně 1 hodinu. Poté byl produkt oddělen vakuovou filtrací, vyjmut a suspendován ve 100 ml ledového acetonu, znovu oddělen filtrací, na filtru ještě několikrát promyt přebytkem ledové vody a vysušen do konstantní hmoty.

V 10 opakovaných cyklech použití těžé násady katalyzátoru bylo celkem získáno 292 g 7-ADCK o průměrném obsahu účinné látky 96,94 % a celkovém výtěžku 89,7 % teorie. Specifická aktivita katalyzátoru se po jeho 10násobném opakovaném použití nezměnila. Úbytek hmoty katalyzátoru činil po 10 cyklech 2 % vztaženo na sušinu částic a neovlivnil reakční rychlost a stupeň konverze mezi 1. a 10. cyklem jeho opakovaného použití.

Příklad 3

Chemicky vázané mikrobiální buňky s penicilinacylázovou aktivitou, získané postupem podle čs. autorského osvědčení č. 209 265 o parametrech:

specifická aktivita 2,5 j./mg vlhké hmoty materiálu, částic ve formě granulí o velikosti 1–3 mm a průměrném obsahu sušiny 40 %, byly v množství 55 g naplněny do skleněného sloupce o průměru 2,6 cm s temperovaným pláštěm. Imobilizovaným materiálem bylo čerpáno 0,5 l 0,5-molárního fosfátového pufru pH 7,9, v kterém byla rozpuštěna K-sůl DAOC-G v koncentraci 3% hmota/objem směrem zdola nahoru rychlostí 2030 ml/hod., při teplotě 37 °C. Za tohoto

uspořádání bylo provedeno 5 opakovaných enzymových konverzí 0,5 l roztoku substrátu uvedené koncentrace s touže násadou katalyzátoru umístěnou trvale ve sloupci, recirkulací reakční směsi při kontinuální úpravě pH zředěnou čpavkovou vodou (1 : 1) na hodnotu 7,9 v mimo sloupec umístěné skleněné míchané nádobě, v níž byla vestavěna pH-elektroda spřažená s pH-statem. Reakční doba pro každý cyklus enzymové konverze v recirkulačním reaktoru činila 120 min.

Po skončení každé z enzymových konverzí byla zreagovaná kapalina zpracována stejným způsobem, jak je uvedeno v příkladu 2 s tím rozdílem, že namísto benzínu byl předložen předchlazený petroléter v množství 160 ml a odsátý produkt po krystalizaci byl suspendován opět v petroléteru, znovu odsát a promyt ledovou vodou a vysušen do konstantní hmoty.

V 5 opakovaných cyklech použití těžé násady katalyzátoru v recirkulačním reaktoru s jeho vznosným ložem bylo celkem získáno 36,5 g 7-ADCK o průměrném obsahu účinné látky 97,7 % a celkovém výtěžku 91,09 proc. teorie.

Příklad 4

2 1-litrové skleněné laboratorní fermentační tanky umístěné ve vodní lázni vyhřívané na 37 °C byly naplněny každý 200 g vázaných buněk s penicilinacylázovou aktivitou, jejichž parametry byly uvedeny v příkladu 1. Reaktory měly vestavěny pH-elektrody spřažené s pH-staty a dávkovač zařízením roztoku alkálie. Do každého z reaktorů bylo přilito 500 ml 6% vodného roztoku K-soli DAOC-G o pH 7,8 a spuštěna míchadla, jejichž intenzita činila 80 až 100 otáček/min. Enzymová reakce z počátku probíhala vsádkovým způsobem za míchání, teplota a kontinuální úprava pH čpavkovou vodou na hodnotu 7,8, dokud koncentrace substrátu neklesla v prvním reaktoru na 10–15 %, v druhém reaktoru na 2–0 % výchozího množství. Po dosažení tohoto stavu byl postupně spuštěn kontinuální provoz. Ze zásobníku, který obsahoval 6% roztok DAOC-G vychlazený na +5 °C, byl čerpán pomocí jednoho čerpadla roztok substrátu do 1. reaktoru rychlostí 0,46 litrů/hod., částečně zhydrolyzovaný roztok substrátu pomocí 2. čerpadla z 1. reaktoru do 2. reaktoru rychlostí 0,47 litrů/hod. (korekce na vzrůst objemu způsobeném zvětšením objemu v prvním reaktoru přítokem většího množství alkálie) a pomocí třetího čerpadla z 2. reaktoru do chlazeného zásobníku zreagované konverzní směsi (+5 °C) rychlostí v rozmezí 0,46 až 0,48 litrů/hod. V obou reaktorech bylo udržováno pH reakční směsi kontinuálně dávkováním 16% čpavkové vody pomocí dvou nezávislých pH-statů. Zadržování částic katalyzátoru v reaktorech bylo dosaženo tím,

že trubice odsávající reakční směs z reaktorů byly opatřeny filtrační plachetkou, která byla umístěna těsně nad míchadlem.

Kontinuální míchané reaktory zapojené v sérii byly v nepřetržitém provozu 25 hodin, přičemž za tuto dobu bylo kvantitativně hydrolyzováno 11,7 litrů substrátu na požadovaný produkt. Izolace 7-ADCK byla prováděna krystalizací produktu jen z vodné fáze se suspendací a promytím etanolem postupem uvedeným v příkladu 1. Bylo získáno 370,6 g produktu o průměrném obsahu 7-ADCK 96,9 %, což je 87,6 % teorie. Specifická aktivita katalyzátoru se po 25 hodinách nepřetržitého provozu nezměnila.

Příklad 5

1 kg vlhké hmoty buněčné pasty jednotlivě kovalentně zesíťovaných permeabilizovaných a promytých buněk *E. coli* s penicilinacylázovou aktivitou (8 j./mg vlhké hmoty), získaných postupem podle čs. autorského osvědčení č. 201 621, bylo suspendováno v 9 litrech pitné vody a pH suspenze bylo upraveno 1 N roztokem NaOH na hodnotu 7,9. 10 litrů takto připravené homogenní buněčné suspenze bylo přečerpáno do 20litrového skleněného fermentačního tanku umístěného ve vodní lázni temperované na 37 °C, do kterého byla vestavěna skleněná pH elektroda spojená v dřívějších příkladech zmíněným automatickým zařízením na kontinuální úpravu pH. Poté bylo do míchané (250 otáček/min.) vodné suspenze nasypáno

513 g K-soli DAOC-G a kontinuálně udržováno pH na hodnotě 7,8 1 N roztokem NaOH po dobu 90 min. Po této době byly zesíťované buňky odstředěny na odstředivce Sharples. Bylo získáno 8,4 litrů čirého supernatantu, z kterého byla izolována 7-ADCK jak bude dále uvedeno.

Řídká buněčná pasta obsahující část zreagované reakční směsi z předcházejícího cyklu byla suspendována opět v 9 litrech vody a celý postup enzymové hydrolyzy čerstvého roztoku substrátu byl popsáným způsobem 5× opakován, přičemž v průběhu semikontinuálního použití byly před zahájením dalšího cyklu (po kontrole množství biomasy stanovením její sušiny) kompenzovány hmotnostní ztráty způsobené vlivem manipulace při odstřeďování, doplněním čerstvé zásobní zesíťované a nepoužité biomasy 20 gramů vl. hm. v třetím cyklu a 50 gramů vl. hm. v pátém semikontinuálním cyklu.

Z jednotlivých semikontinuálních cyklů byla ze supernatantu izolována 7-ADCK postupem uvedeným v příkladu 2 za použití předloženého vychlazeného benzínu v množství 3 litry/cyklus, zpracování supernatantu zreagované kapaliny, suspendace produktu po filtraci v 1 litru ledového acetonu a promytí ledovou vodou.

V 5 semikontinuálních cyklech bylo celkem získáno 1,25 kg produktu o obsahu 7-ADCK 96,9 % a celkovém výtěžku 85,33 % teorie.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob enzymové výroby kyseliny 7-aminodesacetoxycefalosporanové vyznačující se tím, že se vodný roztok kyseliny 7-fenylacetamidodesacetoxycefalosporanové, s výhodou jejích solí, o koncentraci 0,05 až 10% hmota/objem, s výhodou 6% hmota/objem, s hodnotou pH 7,0 až 8,5, s výhodou pH 7,8, uvádí při teplotě 10 až 45 °C, s výhodou 37 °C, diskontinuálně, semikontinuálně nebo kontinuálně ve styk s biokatalyzátorem na bázi zesíťované a permeabilizované biomasy mikrobiálního producenta penicilinacylázy nebo na bázi agregovaných nebo navzájem chemicky vázaných buněk producenta tohoto enzymu, načež se po ukončené konverzi ze supernatantu, popří-

padě z matečného louhu po úpravě pH a teploty izoluje kyselina 7-aminodesacetoxycefalosporanová.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že izolace kyseliny 7-aminodesacetoxycefalosporanové se provádí v rozmezí teplot -1 až +15 °C, v rozmezí hodnot pH 3,5 až 5,0, s výhodou +2 °C a pH 4,2, popřípadě v přítomnosti s vodou nemísitelných organických rozpouštědel, zejména benzínu nebo petroléteri a/nebo se vykřystalizovaný produkt suspenduje v organických rozpouštědlech mísitelných s vodou, s výhodou v etanolu či acetonu, nebo se oba způsoby kombinují.