



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

258259

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

A 23 L 1/236

(22) Přihlášeno 23 03 85

(21) pv 2101-85

(40) zveřejněno 17 12 87

(45) vydáno 14 04 89

(75)
Autor vynálezu

MALANÍK VIKTOR RNDr. CSc., KOUŘIM, MAREK MIROSLAV ing. CSc., PRAHA,
MALANÍKOVÁ MARTA RNDr., KŘIŠTAN VLADIMÍR ing., KOUŘIM,
PŠENÍČKA IVAN RNDr., OPOLANY, KÁŠ JAN ing. CSc., PRAHA

(54) **Způsob výroby kyseliny L-asparagové pomocí heterogenních biokatalyzátorů**

Řešení se týká způsobu výroby kyseliny L-asparagové pomocí heterogenních biokatalyzátorů založených na bázi mikrobiálních buněk s aspartasovou aktivitou. Způsob spočívá v tom, že se vodný roztok fumaranu amonného uvádí ve styk s biokatalyzátory, které se předem připraví působením oktyl-fenolpolyetylen glykoletheru nebo nonyl-fenolpolyetylenoxidu nebo přímo roztokem amonné soli kyseliny fumarové nebo asparagové s přídavkem amoniaku na mikrobiální buňky, obsahující enzym L-aspartat:amoniak lyazu, zabudované do gelu genu-carrageenanu, potom po ukončení konverze se izoluje z odděleného kapalného podílu kyselina L-asparagová. Tato aminokyselina lze používat při výrobě léčiv a při výrobě umělého sladila.

Vynález se týká způsobu výroby kyseliny L-asparagové z fumaranu amonného pomocí mikro-biálních buněk s aspartasovou aktivitou do genu-carrageenanu.

Kyselina L-asparagová se ve stále větší míře používá ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu a je důležitou složkou "sladkého dipeptidu" Aspartamu i významnou složkou některých léků. Z těchto důvodů se neustále zvyšuje zájem o ekonomickou velkovýrobu této důležité aminokyseliny. Vzhledem k tomu, že pro řadu aplikací je použitelný pouze L-stereoisomer této kyseliny, je z ekonomických důvodů vhodné a to i v případech, kdy mohou být aplikovány současně oba antipody při pochopitelném využití pouze L-formy, vyrábět biologicky aktivní L-stereoisomer kyseliny asparagové především biologickou cestou umožňující selektivní produkci požadovaného enantiomeru.

Transformaci kyseliny fumarové na kyselinu L-asparagovou je možno realizovat pomocí buněk mikroorganismů různých kmenů z rodů *Alcaligenes*, *Corynebacterium* a *Escherichia*, jež se vyznačují aspartasovou aktivitou. Jednorázovou submerzní kultivací vypěstované buňky se buď s kultivačním médiem nebo po oddělení od kultivačního média suspendují v roztoku substrátu, tj. fumaranu amonného, který je při vhodném pH a teplotě za míchání konvertován na amonnou sůl kyseliny L-asparagové. Po oddělení buněk a následném okyselení se izoluje kyselina L-asparagová.

Při tomto způsobu je nutno pro každou výrobní šarži vypěstovat vždy nové buňky ve velkokapacitních fermentačních tancích, což je s ohledem na surovinové a energetické náklady včetně potřeby velkého investičně náročného zařízení ekonomicky značně nevýhodné.

Z uvedeného důvodu byla vypracována řada postupů /Švec F. a spol.: Chem. Listy 74, 82 /1980//, které umožňují vícenásobné nebo kontinuální využití enzymu aspartasy /L-aspartat: amoniaklyasy E.C.: 4.3.1.1 /buď vázané na vhodný nosič po izolaci z příslušného mikroorganismu, nebo přímo ve formě imobilizovaných buněk s aspartasovou aktivitou. Využití mikrobiálních buněk v imobilizované formě má oproti imobilizovaným enzymům řadu výhod především ekonomického charakteru, poněvadž odpadá mnohdy nákladná izolace enzymu, v důsledku čehož je cena připraveného biokatalyzátoru nižší. Biokatalyzátory připravené imobilizací buněk mají většinou i vyšší operační stabilitu /Marek M. a Káš J.: Chem. průmysl 34, 546 /1984//.

Pro imobilizaci buněk s aspartasovou aktivitou byly rozpracovány dva principiálně odlišné postupy - metoda zabudování buněk do různých druhů polymerních matic a metoda kovalentního zesílení vnitrobuněčného obsahu jednotlivých mikrobiálních buněk nebo navzájem chemicky vázaných buněk pomocí bifunkčních síťovacích činidel, především pomocí glutaraldehydu /Čs. autorského osvědčení č. 209 265/.

Základem průmyslové kontinuální výroby kyseliny L-asparagové se stal v první polovině 70. let vypracovaný postup imobilizace buněk do polyakrylamidu /Chibata I. a spol.: Appl. Microbiol. 27, 878 /1974//. Radikálovou polymerací akrylamidu s N,N'-metylen-bis-akrylamidem /USA pat. spis č. 3 791 926/ se připraví zesílený syntetický gel se zabudovanými buňkami, jehož operační poločas činí až 120 dní. Uvedený postup však má i řadu nevýhod.

Dosud není znám způsob provedení polymerace, podle kterého by bylo možné připravit částice gelu sférického tvaru a alespoň přibližně shodné velikosti, které by zaručovaly optimální hydrodynamické vlastnosti biokatalyzátoru. Největším nedostatkem uvedeného postupu je však skutečnost, že byť i krátkodobým stykem buněčného materiálu s monomery akrylamidem s N,N'-metylen-bis-akrylamidem dochází ke snížení aktivity aspartasy. Při polymeraci se navíc uvolňuje teplo, které rovněž snižuje enzymovou aktivitou imobilizovaných buněk. K nevýhodám uvedeného postupu patří i nebezpečí, že látky vyrobené použitím takto připraveného biokatalyzátoru mohou obsahovat toxické zbytky nezpolymerovaných monomerů, což je z hygienického a zdravotnického hlediska nepřijatelné.

Z uvedených důvodů byl koncem sedmdesátých let vypracován a technologicky realizován

nový způsob výroby kyseliny L-asparagové pomocí biokatalyzátoru připraveného zabudováním buněk s aspartasovou aktivitou do kappa-carrageenanu (Sato T. a spol.: *Biochim. Biophys. Acta* 570, 179 /1979//. Kappa-carrageenan je polysacharid, který se získává extrakcí mořských řas *Chondrus crispus* horkou vodou a následnou separací od lambda-carrageenanu pomocí frakční precipitace draselnými ionty /Rees D. A.: *J. Chem. Soc.* 1963, 1821/.

Pomocí draselných, amonných, vápenatých a jiných iontů /Tosa T. a spol.: *Biotechnol. Bioeng.* 21, 1697 /1979// je možno z kappa-carrageenanu vytvořit gelovité částice různých fyzikálních vlastností a tvarů, které mají vedle dostatečné pevnosti i výborné hydrodynamické vlastnosti. Zabudováním buněk s aspartasovou aktivitou do gelu kappa-carrageenanu je pak připraven biokatalyzátor, který má vedle vysokého podílu zachované enzymové aktivity i značně vysokou stabilitu. V literatuře /Nishida Y. a spol.: *Enzyme Microb. Technol.* 6, 85 /1984// je uváděn operační poločas až 680 dní.

Pro přípravu biokatalyzátoru analogických vlastností je možno použít též genu-carrageenanu, to je surového carrageenanového preparátu izolovaného z řas rodu *Gigartina* a *Solieria* /Genu-carrageenan: A/S Kobenhavns Pektinfabrik, Dánsko/. Na rozdíl od izolovaného čistého kappa-carrageenanu se jedná o technický směsný carrageenanový preparát běžně používaný v potravinářském průmyslu, který je přibližně 40krát levnější kappa-carrageenan. Zabudováním buněk s aspartasovou aktivitou do gelu genu-carrageenanu je připraven vysoce stabilní biokatalyzátor s definovanou velikostí částic vhodných fyzikálních i hydrodynamických vlastností.

Na základě uvedených poznatků týkajících se vlastností genu-carrageenanu byl vypracován způsob výroby kyseliny L-asparagové pomocí heterogenních biokatalyzátorů podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se vodný roztok fumaranu amonného o koncentraci 0,75 až 22,5 % hmot. s hodnotou pH 6,5 až 9,5, s přísadou hořčičných iontů s výhodou v koncentraci 0,002 5 % hmot. uvádí ve styk při teplotě 10 až 50 °C s heterogenním biokatalyzátorem, který se připraví působením octylphenolpolyetylen glykoletheru nebo nonylphenolpolyetylenoxidu nebo přímo roztokem amonné soli kyseliny fumarové či asparagové s přísadkou amoniaku, na mikrobiální buňky, obsahující enzym L-aspartát:amoniak lyazu, zabudované do gelu genu-carrageenanu, načež se po ukončené konverzi izoluje z odděleného kapalného podílu kyselina L-asparagová.

Pro způsob výroby kyseliny L-asparagové podle vynálezu je možno použít různých mikrobiálních druhů a kmenů, popřípadě vysokoprodukčních mutantů různých mikroorganismů syntetizujících enzym aspartasu, například různých kmenů z rodu *Escherichia*, *Alcaligenes* a *Corynebacterium*, s výhodou mikrobiálního kmene *Escherichia alcalescens* CCEB Asp 24 kultivovaného podle čs. autorského osvědčení 220 460.

Hlavní výhody způsobu výroby kyseliny L-asparagové dle vynálezu jsou spojeny s jednoduchostí přípravy biokatalyzátoru, v cenové atraktivnosti k imobilizaci buněk používaného genu-carrageenanu, ve vysokém stupni zachování aspartasové aktivity buněk během přípravy biokatalyzátoru a v neposlední řadě ve vysoké stabilitě aplikovaného biokatalyzátoru. Vysoké operační stability biokatalyzátoru je dosaženo zvláště při imobilizaci buněk do genu-carrageenanu za přítomnosti sloučenin obsahujících vysoký podíl hydroxylových skupin například taninu, případně též po následném zpevnění částic gelu pomocí 1,6-diaminohexanu a glutaraldehydu. Operační poločas u takto připravených biokatalyzátorů činí minimálně 180 dní.

Způsob výroby kyseliny L-asparagové dle vynálezu je výhodný zvláště pro konitnuální uspořádání, neboť používaný biokatalyzátor má výborné sedimentační a hydrodynamické vlastnosti pro použití v kolonách ve formě pevného nebo fluidního lože. Z filtrátu, respektive kapalného podílu reakční směsi odděleného od biokatalyzátoru se kyselina L-asparagová získá úpravou pH pomocí minerální kyseliny na hodnotu 2,8 a následnou krystalizací při teplotě 10 až 20 °C.

Vykrystalovaná kyselina L-asparagová se odfiltruje, promyje studenou vodou a usuší, případně dále dle potřeby.

Postupem podle vynálezu připravená kyselina L-asparagová je velmi čistá, použitelná zejména pro přípravu různých solí používaných jako léčiva, například kardiotonikum Cardilan /Spofa/, to je hořečnato-draselná sůl kyseliny L-asparagové.

Při výrobě kyseliny L-asparagové podle vynálezu je účinnost konverze 100% při zajištění optimálních podmínek, to je množství biokatalyzátoru, počáteční koncentrace substrátu a průtokové rychlosti. Výtěžek izolované čisté kyseliny L-asparagové se pohybuje kolem 94 až 96 % hmot. teoretického zisku.

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

P ř í k l a d 1

Produkční kmen *Escherichia alcalescens* Asp 24 byl ze šikmého agaru zaočkován kličkou do 250 ml Erlenmayerovy baňky obsahující 70 ml živného sterilního média tohoto složení: 1 % hmot. kvasničný autolýzát, 0,5 % hmot. pepton, 0,9 % hmot. kyselina fumarová a 0,75 % objem. hovězího vývar 5 x koncentrovaný, pH 7,0. Kultivace vegetativního inokula probíhala na rotační třepačce 16 hodin při teplotě 37 °C. Získané inokulum bylo použito k zaočkování vlastních produkčních baněk.

Získaným inokulem bylo zaočkováno 10 varných kulatých baněk o objemu 750 ml, jež obsahovaly po 100 ml živného média výše uvedeného složení. Bylo použito 1 ml inokula na 100 ml živného média. Kultivace probíhala na rotační třepačce po dobu 16 hodin při teplotě 37 °C. Po ukončení kultivace byly suspenze buněk slity, stanovena enzymová aktivita, která byla 31 μ kat/g vlhkých buněk, buňky byly odstředěny a získaný sediment byl použit pro přípravu heterogenního biokatalyzátoru.

Vlhká buněčná pasta byla rozmíchána ve fyziologickém roztoku tak, aby vznikla suspenze o obsahu 20 % hmot. vlhkých buněk. Suspenze byla zahřáta na teplotu 50 °C a poté bylo přidáno stejné množství 5 % hmotnostního roztoku genu-carrageenanu 55 °C teplého. Směs byla důkladně promíchána, ochlazená na teplotu 10 °C a převrstvena 2,24 % hmot. roztokem chloridu draselného o teplotě 10 °C. Po 24 hodinách byl vzniklý heterogenní biokatalyzátor rozmixován v mixeru, suspenze biokatalyzátoru byla odstředěna a sediment byl použit pro diskontinuální přípravu kyseliny L-asparagové.

Heterogenní biokatalyzátor o aktivitě 1,7 μ kat/g vlhkého gelu v množství 50 g vlhké hmotnosti byl rozsuspendován v 1 litru 14,9 % hmot. roztoku fumaranu amonného, pH 8,5, jež obsahoval 0,08 % objem. nonylphenolpolyetylenoxidu. Suspenze byla míchána při 37 °C. Ke 100% konverzi na asparát amonný došlo za 4 hodiny. Po této době byla reakční směs odstředěna, sediment biokatalyzátoru znovu resuspendován v 1 l 14,9 % hmot. roztoku fumaranu amonného a celý postup byl opakován.

Konverze byly opakovány celkem 9krát bez znetelné ztráty enzymové aktivity heterogenního biokatalyzátoru. Ze supernatantů byla izolována kyselina L-asparagová úpravou pH na 2,8 pomocí kyseliny sírové o koncentraci 70 % hmot. a ochlazením na teplotu 10 °C. Celkový výtěžek byl 1 120 g kyseliny L-asparagové, to je 94,2 % hmot. teoreticky získatelného množství.

P ř í k l a d 2

Buňky kmene *Escherichia alcalescens* Asp 24 byly připraveny shodným postupem jako v příkladu 1. Získaná buněčná pasta byla rozmíchána ve fyziologickém roztoku tak, aby vznikla 40 % hmot. suspenze vlhkých buněk. Suspenze byla zahřáta na teplotu 45 °C a poté k ní bylo přidáno třináásobné množství 4 % hmotnostního roztoku genu-carrageenanu o teplotě 50 °C. Směs byla důkladně promíchána a za tepla kapána do chladného roztoku chloridu draselného o koncentraci 2,24 % hmot. převrstveného vrstvou parafinového oleje. Vytvořené kuličky heterogenního biokatalyzátoru byly ponechány 24 hodin v roztoku chloridu draselného o koncentraci 2,24 % hmot. a teplotě 10 °C. Jejich povrch byl zpevněn následujícím postupem.

Kuličky heterogenního biokatalyzátoru o celkové hmotnosti 100 g a průměru okolo 3,5 mm byly vychlazeny na 5 °C a převrstveny 113 ml roztoku, který obsahoval 0,5 M fosfátový pufr pH 7,0, chlorid draselný o koncentraci 2,24 % hmot. a 1,6-diaminohexan o koncentraci 0,99 % hmotnostních.

Roztok měl teplotu 5 °C. Směs byla mírně míchána po dobu 5 minut a poté bylo přidáno 48,6 ml o složení: 0,5 M fosforečnanový pufr, pH 7,0 chlorid draselný o koncentraci 2,24 % hmot. a glutaraldehyd o koncentraci 0,95 % hmot. Vše bylo opět mícháno při 5 °C po dobu 30 minut. Červeně zbarvené kuličky biokatalyzátoru byly několikrát promyty dostatečným množstvím roztoku chloridu draselného o teplotě 10 °C a koncentraci 2,24 % hmot. Část kuliček byla použita ke stanovení enzymové aktivity a 90 g biokatalyzátoru bylo použito k semi-kontinuální konverzi fumaranu amonného na L-aspartan amonný.

Kuličky heterogenního biokatalyzátoru o aktivitě 0,85 μ kat/g vlhkého biokatalyzátoru byly převrstveny 1 l fumaranu amonného o koncentraci 14,9 % hmot., pH 8,5, jež obsahoval octylphenolpolyetylen glykoether o koncentraci 0,2 % objem. Směs byla jemně míchána při 37 °C. Ke 100% konverzi na L-aspartan amonný došlo za 9,5 hod. Roztok aspartanu amonného byl opatrně odsát a konverze byla opakována výše popsaným způsobem celkem 15krát. Ztráta aktivity biokatalyzátoru po ukončení všech konverzí nepřevýšila 2,5 % původní aktivity.

Ze spojených odsátých roztoků aspartanu amonného bylo postupem uvedeným v příkladu 1 izolováno 1 880 g kyseliny L-asparagové, což představuje 95 % teoretického zisku.

P ř í k l a d 3

Buňky kmene *Escherichia alcalescens* Asp 24 byly získány postupem shodným jako v příkladu 1. Buněčný sediment byl rozmíchán ve fyziologickém roztoku tak, aby vznikla suspenze o koncentraci 42,5 % hmot. vlhkých buněk. Směs byla zahřáta na teplotu 45 °C a poté k ní bylo přidáno třináásobné množství 50 °C teplého roztoku genu-carrageenanu o koncentraci 4 % hmot. Po důkladném promíchání byl ke směsi přidán roztok taninu ve fyziologickém roztoku o koncentraci 1 % hmot. tak, aby výsledná koncentrace taninu v gelu byla 0,1 % hmot. Vše bylo opět důkladně promícháno a za tepla vylito na misku tak, aby vrstva gelu byla vysoká maximálně 5 až 6 mm.

Ztuhlý gel byl převrstven roztokem chloridu draselného o koncentraci 2,24 % hmot. a ponechán 24 hodin při 10 °C. Vytvrzený gel byl rozřezán na částice 5 x 5 x 5 mm a poté použit na kontinuální kolonovou přípravu kyseliny L-asparagové.

Kostičky heterogenního biokatalyzátoru o celkové hmotnosti 95 g a aktivitě 0,75 μ kat/g vlhkého biokatalyzátoru byly naplněny do termostatované kolony o rozměrech 2,6 x 25 cm a teplotě 37 °C a gel byl ponechán aktivovat po dobu 48 hodin průtokem 140 ml/hod roztokem fumaranu amonného o koncentraci 14,9 % hmot. a při pH 8,5. Po skončení aktivace byl průtok fumaranu amonného snížen na 70 ml/hod. Konverze fumaranu amonného na L-aspartan amonný probíhala při 37 °C po dobu 40 dnů bez zjiitelné změny enzymové aktivity použitého biokatalyzátoru. Celkem bylo za uvedené období zkonvertováno 67,2 l roztoku fumaranu amonného. Izolací podle příkladu 1 bylo získáno 8,35 kg kyseliny L-asparagové, což je 94,1 % teoretického množství.

P ř í k l a d 4

Buňky kmene *Escherichia alcalescens* Asp 24 byly získány postupem shodným jako v příkladu 1. Buněčný sediment byl rozmíchán ve fyziologickém roztoku tak, aby vznikla suspenze o koncentraci 42,5 % hmot. vlhkých buněk. Směs byla zahřáta na teplotu 45 °C a poté k ní bylo přidáno třináásobné množství 50 °C teplého roztoku genu-carrageenanu o koncentraci 4 % hmot. Po důkladném promíchání byl ke směsi přidán roztok taninu ve fyziologickém roztoku o koncentraci 1 % hmot. tak, aby výsledná koncentrace taninu v gelu byla 0,1 % hmot. Směs byla důkladně promíchána a za tepla kapána do chladného roztoku chloridu draselného o koncentraci 2,24 % hmot. a teplotě 10 °C.

Kuličky heterogenního biokatalyzátoru o aktivitě 1,35 μ kat na 1 g vlhkého biokatalyzátoru byly naplněny do kolony a při 45 °C aktivovány po dobu 48 h roztokem fumaranu amonného o koncentraci 22 % hmot. a pH 9,5. Po skončení aktivace byla prováděna konverze fumaranu amonného na L-aspartan amonný za shodných podmínek při průtoku 100 ml/h. Po 60 dnech nebyla zaznamenána změna enzymové aktivity použitého biokatalyzátoru. Po izolaci bylo celkem získáno 17,1 kg kyseliny L-asparagové, což je 95 % teoretického výtěžku.

P ř í k l a d 5

Ke kuličkám heterogenního biokatalyzátoru připraveného podle příkladu 4 byl přidán roztok fumaranu amonného o koncentraci 1 % hmot., pH 6,5, obsahující oktylphenolpolyetylen-glykolether o koncentraci 0,2 % objem. Směs byla jemně míchána při 15 °C. Ke 100% konverzi na L-aspartan amonný došlo za 2 h. Roztok aspartanu amonného byl opatrně odsát a konverze byla opakována uvedeným způsobem celkem 20krát. U biokatalyzátoru nebyla zaznamenána ztráta původní enzymové aktivity.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob výroby kyseliny L-asparagové pomocí heterogenních biokatalyzátorů pomocí mikrobiálních buněk s aspartasovou aktivitou vyznačující se tím, že se vodný roztok fumaranu amonného o koncentraci 0,75 až 22,5 % hmot., s hodnotou pH 6,5 až 9,5 a přísadou hořčnatých iontů uvádí při teplotě 10 až 50 °C ve styku s heterogenním biokatalyzátorem, který se předem připraví působením oktylphenolpolyetylen-glykoletheru nebo nonylphenolpolyetylenoxidu nebo přímo roztokem amonné soli kyseliny fumarové nebo asparagové s přísadkou amoniaku na mikrobiální buňky, obsahující enzym L-asparát:amoniak lyázu, zabudované do gelu genu-carrageenanu, načež se po ukončení konverze izoluje z odděleného kapalného podílu kyselina L-asparagová.