



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU 222 941

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 29 12 81
(21) pV. 9958-81

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁷ C 07 C 49/245

(40) Zveřejněno 30 11 82
(45) Vydáno 01 03 84

(75)

Autor vynálezu ČULÍK KAREL RNDr.,
ULBERT STANISLAV ing.,
VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc., PRAHA,
VODŇANSKÝ MILAN ing., ROZTOKY U PRAHY,

NETRVAL JIŘÍ RNDr.,
SOUHRADA JOSEF RNDr., PRAHA

(54) Způsob ekonomizace výroby D-(-)-1-fenyl-1-hydroxy-2-propanonu pro přípravu L-(-)-efedrinu

Vynález se týká způsobu ekonomizace výroby D-(-)-1-fenyl-1-hydroxy-2-propanonu optimalizací kultivačních podmínek a chemického složení živné půdy produkčních kvasinek a řízení kultivace, zejména produkčního mikroorganismu *Saccharomyces coreanus* CCM 3395 a optimalizací řízením procesu biotransformace benzaldehydu na D-(-)-1-fenyl-1-hydroxy-2-propanon, který slouží jako meziprodukt pro výrobu L-(-)-efedrinu. Vynález rovněž specifikuje podmínky, za kterých se dosahuje zvýšení výtěžnosti v izolaci tohoto meziproduktu.

222 941

Vynález se týká ekonomizace výroby D-(-)-1-fenyl-1-hydroxy-2-propanonu (D-(-)-fenylacetylmethanolu, dále jen D-(-)-FAM) optimalizací kultivačních podmínek a chemického složení živné půdy produkčních kvasinek a řízení kultivace, zejména *Saccharomyces coreanus* CCM 3395, a optimalizací a řízením procesu biotransformace benzaldehydu na D-(-)-FAM, pro výrobu L-(-)-efedrinu.

Je známo, že D-(-)-FAM slouží jako výchozí surovina pro výrobu L-(-)-efedrinu. Vedle různých známých způsobů přípravy D-(-)-FAM, je nejvíce používán biochemický způsob jeho přípravy pomocí kvasinek stereospecificky biotransformujících benzaldehyd na tento důležitý meziprodukt. Biologický princip biotransformace pomocí kvasinek je dostatečně popsán nejen pro tradiční druhy kvasinek, pivovarské a pekařské kvasnice, např. Voets et al., *Ztschr. für Allg. Mikrobiol.*, 13, 355, 1973, ale i pro netradiční taxony kvasinek včetně způsobu jejich šlechtění v čs. a.o. 202 929. Vzniklý D-(-)-FAM se pak izoluje z fermentační kapaliny a podrobí se reduktivní aminaci s cílem přípravy L-(-)-efedrinu, za chemické katalýzy pomocí speciálních typů katalyzátorů, např. na bázi platiny. Katalytickou reduktivní aminaci lze provádět různými způsoby, avšak pro D-(-)-FAM vyrobený pomocí netradičních taxonů kvasinek je výhodné použít způsobu popsaného v čs. autorském osvědčení č. 213 159.

V patentové literatuře je využití pivovarských a pekařských kvasinek transformujících benzaldehyd na D-(-)-FAM prvně popsáno v r. 1934 v US patentovém spisu č. 1 956 950. Z poslední doby v NDR patentovém spisu č. 51 651 z roku 1966. V citovaných patentových spisech a v odborné literatuře, např. D. Grégr et al., *Ztschr. für Allg. Mikrobiol.*, 6, 275, 1966; Gupta et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 21, 1085, 1979 jsou popisovány produkce D-(-)-FAM biotransformací benzaldehydu od 300 do maximálně 800 mg/100 ml fermentační půdy. V čs. autorském osvědčení 202 929 je popsán způsob selekce netradičních kmenů kvasinek a jejich šlechtění a vysoko produkční kmen *Saccharomyces coreanus* CCM 3395, který je v laboratorním měřítku schopen produkovat D-(-)-FAM v rozmezí 900 až 1 300 mg/100 ml a v měřítku do objemu fermentačního tanku 100 litrů až 1 100 mg/100 ml při nesterilní submersní kultivaci

v živné půdě obsahující amonné ionty ve formě síranu amonného, vysoký obsah kukuřičného extraktu, vysoké koncentrace hořecných iontů, anorganických fosfátů, sacharózy apod., při konstantní teplotě v rozsahu 28 až 29 °C.

Zjistili jsme nyní, že v této živné půdě dochází k růstové diauxii, tj. dvojrůstu tak, že v první fázi růstu se spotřebují přednostně amonné ionty jako jediný zdroj dusíku spolu se sacharózou jako zdrojem uhlíku a po růstovém lagu (prodlevě) začíná druhý růst kultury, kdy je využíván z počátku kukuřičný extrakt jako organický zdroj C i N a posléze etanol vytvořený v první fázi růstu ze sacharózy, neboť při relativně nízkých přenosech kyslíku není veškerá sacharóza konvertována na biomasu (sušinu buněk). Při převodu (scale-up) z laboratorního resp. poloprovozního měřítka do výrobního zařízení (25 až 30 m³ fermentory) činila růstová diauxie značné potíže, které se projevíly v nereprodukovatelnosti výsledků, v nízké produkční rychlosti i absolutním výtěžku D(-)-FAM a ve vysoké četnosti sekundárních kontaminací kultury kvasinek bakteriemi, přičemž pravděpodobnost bakteriální sekundární kontaminace kultury byla favorizována růstovou diauxií produkčního kmene, tj. časovou prodlevou mezi skončením první fáze růstu a započatím druhé fáze růstu. Navíc při počátečním a diauxickém lagu byla nerostoucí kultura poškozována smykovým namáháním v zóně míchadla, takže produkční schopnost a celkový metabolismus buněk byly silně sníženy, z čehož rezultovala značná produkční variabilita. Z laboratorního a poloprovozního měřítka bylo zjištěno optimální vzdušnění během submersní kultivace *S. coreanus* CCM 3395 v rozmezí 0,05 až 0,2 objemu vzduchu/min. podmiňující semianaerobní růst. Při měření rozpuštěného kyslíku v provozním zařízení kyslíkovou elektrodou bylo však zjištěno, že za uvedených podmínek kultivace a chemického složení živné půdy, množství rozpuštěného O₂ v půdě se asymptoticky blíží k nulovým hodnotám již ve 4. hodině kultivační, tj. již na začátku růstu kultury. Tato skutečnost pochopitelně negativně ovlivnila nezbytnou saturaci kultury kyslíkem.

Všechny tyto naznačené negativně se uplatňující faktory měly za následek, že nebylo možno provést úspěšný převod technologie z poloprovozního měřítka do výroby. Navíc takto získaný

222 941

D-(-)-FAM izolovaný z fermentační kapaliny byl z hlediska reprodukovatelnosti průběhu reduktivní aminace za použití speciálního typu katalyzátoru na bázi platiny i za speciálních podmínek hydrogenace, popsaných v čs. autorském osvědčení č. 213 159, obtížně hydrogenovatelný. Z pochopitelných důvodů jsme se proto zaměřili na technologické zvládnutí procesu převodu technologie optimalizací chemického složení živné půdy, podmínek kultivace produkčního mikroorganismu a způsobu řízení biotransformace benzaldehydu na D-(-)-FAM.

Zjistili jsme, že pro úspěšný převod poloprovozních výsledků do daných provozních velkobjemových fermentorů (scale-up), jejichž vybavení je v některých faktorech v podstatě neměnné (příkon elektromotoru, rychlost otáček míchadla a geometrie fermentoru), je nutné docílit reprodukovatelného růstu produkčního mikroorganismu odstraněním růstové diauxie dostatečnou saturací rostoucí buněčné populace rozpuštěným kyslíkem, snížením smykového namáhání kultury mícháním a optimalizací a řízením procesu biotransformace benzaldehydu na D-(-)-FAM.

Variováním chemického složení živné půdy (eliminace anorganického zdroje dusíku, celková koncentrace organického dusíku, poměry fosforu a hořčíku, poměry složek kukuřičný extrakt : hydrolyzátu : sacharóza) fyzikálních (teplota, intenzita míchání a vzdušnění) a fyzikálně chemických (pH, rozp. O_2 a CO_2 v půdě) podmínek kultivace pro produkční mikroorganismy a optimalizací a řízením procesu biotransformace benzaldehydu na D-(-)-FAM, programovaným dávkováním zkvasitelného uhlohydrátu, zejména sacharózy na počátku a v průběhu biotransformace, udržováním nezbytně nutné koncentrace sacharózy, a ovlivněním absolutního výtěžku D-(-)-FAM zvýšením vzdušnění ve fázi jeho zpomalené biosyntézy, jsme dosáhli vyšší reprodukovatelnosti a ekonomizace biotransformační části a rovněž vyšší výtěžnosti při izolaci D-(-)-FAM z fermentované půdy. Zpracování půdy po biotransformaci, zejména extrakce, je totiž ovlivňováno teplotou, stupněm rozbití buněk míchadlem, výživou buněk a stupněm autolysy buněk na konci biotransformace. Příznivý vliv nižší kultivační a biotransformační teploty a dostatečná saturace buněk kyslíkem v růstové fázi napomáhá překo-

návání negativního vlivu smykového namáhání buněk míchadlem při kultivaci a biotransformaci, což se projevuje nízkou koncentrací emulgotvorných látek (zejména bílkovin) v půdě, takže extrakce z vodné do organické fáze probíhá kvantitativněji, extrakt je jiskrný a čirý a při jeho nakoncentrování zahuštěním se výtěžnost surového D-(-)-FAM pohybuje v rozmezí 82 až 85 %, špičkově až 90 %, vztaženo na fermentovanou půdu po biotransformaci, což je o 5 % až 10 % vyšší výtěžek v izolaci ve srovnání s klasickou technologií výroby. Takto získaný D-(-)-FAM lze reprodukovatelněji hydrogenovat reduktivní aminací na L-(-)-efedrin, postupem podle šs. autorského osvědčení č. 213 159.

Předmětný vynález je vyznačen tím, že produkční mikroorganismy, zejména *Saccharomyces coreanus* CCM 3395, se submersně kultivují ve velkoobjemových fermentorech za podmínek, při kterých nedochází k růstové diauxii a nedochází k silné limitaci růstu rozpuštěným kyslíkem, čímž se omezí negativní působení smykového namáhání v zóně míchadla na buněčnou populaci. Těchto podmínek se dosáhne tím, že tekutá živná půda obsahuje jako jediný asimilovatelný zdroj dusíku organický dusík; potřebné množství rozpuštěného kyslíku při maximálním vzdušnění, které daná aparatura a pění dovoluje, se udržuje nižší teplotou než je optimální teplota pro rychlost růstu a intenzitu metabolismu, na místo toho, aby se dostatečný přísun kyslíku udržoval zvýšenou intenzitou míchání.

Předmětný vynález je dále vyznačen tím, že jako zdroje organického dusíku se použije kukuřičného extraktu nebo jeho směsí s hydrolyzáty bílkovinných surovin rostlinného, živočišného a mikrobiálního původu. S výhodou je možné použít směsí kukuřičného extraktu s komerčně dostupným hydrolyzátem Vitana, a/nebo, použít ve směsi s kukuřičným extraktem autolyzáty mikrobiálních buněk, s výhodou autolyzáty kvasničných buněk použitých k biotransformaci benzaldehydu na D-(-)-FAM, čímž je umožněna prakticky bezodpadová technologie.

Vynález je rovněž vyznačen tím, že během kultivace mikroorganismů v průběhu druhé části časového úseku vymezujícího

222 941

exponenciální růst kultury je kultura zředěna 3 až 25 % živné půdy stejného složení jako na počátku kultivace.

Další opatření vedoucí k ekonomizaci a optimalizaci výroby D-(-)-FAM podle předmětného vynálezu se týkají biotransformační části výroby, a to zejména ve třech stupních.

1. navození optimálního metabolického stavu buněčné populace po kultivaci před zahájením biotransformace.
2. regulace rychlosti utilizace sacharózy během biotransformace.
3. ovlivnění absolutního výtěžku D-(-)-FAM.

Navození optimálního metabolického stavu buněčné populace po kultivaci před zahájením biotransformace podle předmětného vynálezu se provádí vhodným využitím crabb-tree efektu (převod aerobně rostoucí populace buněk do anaerobní fáze růstu následující po přidávku zkvasitelného uhlohydrátu, tj. opak Pasteurova efektu) k zvýšení hladiny glykolytických enzymů, jimiž je ze sacharózy generován pyruvát a z něj aktivní acetaldehyd, který je potřebný ke kondenzační reakci s externě přidaným benzaldehydem za vzniku D-(-)-FAM. V praxi to znamená, že po dosažení vhodného nárůstu buněk, obvykle kolem 0,5 až 0,8 objemových procent sušiny, a po vyčerpání původní koncentrace sacharózy, která byla v živné půdě na počátku kultivace, se sníží vzdušnění na 1/2 až 1/4 původní úrovně a před zahájením vlastní biotransformace se přidá první dávka sacharózy v rozmezí 3,0 až 1,0 %, s výhodou 1,5 % (hmota/objem), a po určité časové prodlevě, po 10 až 60 minutách, s výhodou po 15 až 30 minutách, se přidá první dávka benzaldehydu.

Další řízení procesu biotransformace podle vynálezu se týká regulace rychlosti utilizace sacharózy velikostí sacharózových příkrmů v rozmezí 0,2 až 1,5 % vztaženo na objem půdy a udržováním nezbytně nutné hladiny sacharózy v půdě v rozmezí koncentrací 0,4 až 1,2 %.

Dalším opatřením vedoucím k optimalizaci a ekonomizaci bio-

transformace podle vynálezu je ovlivnění absolutního výtěžku D-(-)-FAM zvýšením průtoku vzduchu nadvojnásobek až trojnásobek v době, kdy se začne projevovat výrazné zpomalení biosyntézy D-(-)-FAM.

Předmětný vynález je dále vyznačen tím, že po skončené bio-transformaci se oddělí buňky odstředěním bez předchozího čištění půdy termickou koagulací balastních látek a z čistého vodného supernatantu po filtraci se extrahuje D-(-)-FAM do organické fáze, z které se nakoncentruje zahuštěním, přednostně v rozmezí teplot 40 až 50 °C, maximálně 60 °C, na koncentraci 40 až 55 % (hmota/hmota).

Dále je předmětný vynález doložen v příkladech provedení, aniž by se jimi omezoval.

Příklady provedení

Příklad 1

Do nerezového fermentačního tanku o celkovém objemu 32 000 litrů bylo připraveno 25 000 litrů nesterilní živné půdy o složení:

- 3 % kukuřičného extraktu (50 % suš.)
- 3 % sacharózy
- 0,056 % síranu hořečnatého
- 0,06 % fosforečnanu draselného kyselého

Uvedené procentní koncentrace jsou hmota/objem.

pH půdy bylo upraveno na hodnotu 5,9 40 % roztokem NaOH a obsah tanku vytemperován na teplotu 25 °C.

Fermentační tank byl zaočkován 800 litry kultury *Saccharomyces coreanus* CCM 3395 sterilně kultivované v živné půdě o stejném složení po dobu 19 až 22 hodin při teplotě 20 až 22 °C za vzdušnění 200 litrů/min., v 1 500 litrovém očkovacím fermentačním tanku.

Kultivace probíhala za následujících podmínek. Teplota do

222 941

3. hodiny kultivační 25 °C, a dále až do konce kultivace 20 °C. Míchadlo bylo po zaočkování tanku vypnuto a opět zapnuto ve 4. hodině kultivační. Vzdušnění po celou dobu kultivace činilo 9 m³/min. Ve 12. hodině kultivační byl během exponenciálního růstu kultury přidán 1 m³ (tj. 4 %) půdy o složení, které je uvedeno výše. Kultivace byla ukončena, když koncentrace redukujících látek klesla k nule, sušina buněk dosáhla hodnoty 7,0 g/litr a hodnota pH činila 4,5. Koncentrace ethanolu činila 0,7 % (hmota/objem).

Po skončení kultivace bylo vzdušnění sníženo na 3 m³/min., a byla vnesena počáteční dávka sacharózy 2,5 % (hmota/objem) vztaženo na objem fermentované půdy.

Po 30 minutách, kdy kultura byla převedena do anaerobiózy, bylo vzdušnění zvýšeno na 5 m³/min., a vnesena první dávka benzaldehydu. Dávkování benzaldehydu a sacharózy bylo prováděno způsobem popsaným v československém autorském osvědčení č. 202 929.

V 10. hodině biotransformace, když došlo k zpomalení biosyntézy D-(-)-FAM, bylo zvýšeno vzdušnění na 10 m³/min. Biotransformace byla ukončena v 15. hodině. Bylo dosaženo produkce 1 030 mg D-(-)-FAM/100 ml, tj. při objemu fermentované půdy 26 000 litrů na konci biotransformace bylo získáno 267,8 kg D-(-)-FAM při spotřebě benzaldehydu 1,136 kg a sacharózy 6,9 kg na 1 kg D-(-)-FAM.

Dále bylo provedeno zpracování D-(-)-FAM na L-(-)-efedrin HCl následujícím postupem:

Do 26 000 litrů fermentační půdy obsahující 267,8 kg D-(-)-FAM bylo přidáno 10 kg Carboventu a bez tepelné úpravy byly odseparovány suspensní podíly odstředěním. Supernatant byl vyčeřen filtrací přes vrstvu křemeliny. Čirý filtrát byl extrahován octanem butylnatým. V extraktu bylo získáno 256,3 kg D-(-)-FAM. Extrakt byl po částech zahuštěn za vakua na oběhové odparce tak, aby teplota brýdových par nepřekročila 60 °C. Zahuštěný koncentrát obsahoval 224,0 kg D-(-)-FAM, což představuje výtěžek 83,6 % vztaženo

na obsah D-(-)-FAM ve fermentované půdě. Získaný materiál byl po-
droben reduktivní aminací podle čs. autorského osvědčení č.
213 159 a bylo získáno 183,2 kg L-(-)-efedrinu, tj. výtěžnosti
81,78 %.

Příklad 2

V nerezovém fermentačním tanku o objemu 32 000 litrů byla
provedena příprava půdy a kultivace způsobem uvedeným v příkladu
1. Kultivace byla ukončena, když bylo dosaženo stopové koncentra-
ce redukujících látek, sušina buněk dosáhla hodnoty 7,5 g/litr a
hodnota pH činila 4,4.

Další postup byl shodný s postupem uvedeným v příkladu 1
s tím rozdílem, že sacharóza byla dávkována následujícím způso-
bem:

Počáteční dávka sacharózy činila 2 % vztaženo na fermentovanou
půdu. V průběhu biotransformace byla sacharóza dávkována tak, aby
se její koncentrace v půdě pohybovala v rozmezí 0,5 až 1,0 %.

Biotransformace byla ukončena v 15. hodině. Bylo dosaženo
produkce 1 020 mg/100 ml, tj. při objemu fermentované půdy
26 000 litrů bylo získáno 265,2 kg D-(-)-FAM při spotřebě benz-
aldehydu 1,157 kg a sacharózy 6,2 kg na 1 kg D-(-)-FAM.

*Ve srovnání s postupem uvedeným v příkladu 1 to znamená
úsporu sacharózy 0,7 kg na 1 kg D-(-)-FAM.

Příklad 3

V nerezovém fermentačním tanku o objemu 1 000 litrů byla
provedena příprava 800 litrů nesterilní půdy o složení:

1 % hydrolyzátu Vitana

1,5 % kukuřičného extraktu (50 % suš.)

Uvedené procentní koncentrace jsou hmota/objem.

Další složení půdy bylo shodné jak je uvedeno v příkladu 1.

Kultivace byla provedena způsobem uvedeným v příkladu 1

222 941

s tím rozdílem, že kultivační teplota se pohybovala v rozmezí 26 až 28 °C po celou dobu kultivace. Kultivace byla ukončena, když koncentrace redukujících látek klesla k nule, sušina buněk dosáhla hodnotu 6,8 g/l a hodnota pH činila 4,8.

Biotransformace byla provedena způsobem uvedeným v příkladu 1 s tím rozdílem, že teplota při biotransformaci se pohybovala v rozmezí 26 až 28 °C. Biotransformace byla ukončena v 16. hodině. Bylo dosaženo produkce 1 050 mg D-(-)-FAM/100 ml, tj. při objemu fermentované půdy 840 litrů bylo získáno 8,82 kg D-(-)-FAM při spotřebě benzaldehydu 1,134 kg a sacharózy 6,8 kg na 1 kg D-(-)-FAM.

200 litrů fermentované půdy bylo separací na odstředivce zbaveno suspensních podílů, supernatant byl vyčeren filtrací přes vrstvu křemeliny. 192 litrů čirého filtrátu bylo extrahováno 100 litry octanu butylnatého a směs byla gravitačně rozdělena. Extrakt byl po částech zahuštěn za vakua na oběhové odparce tak, aby teplota brýdových par nepřesáhla 55 °C. Zahuštěný koncentrát obsahoval celkem 1,764 kg D-(-)-FAM.

Tento materiál byl podroben reduktivní aminaci postupem podle čs. autorského osvědčení č. 213 159 a dalším zpracováním bylo získáno 1,48 kg L-(-)-efedrinu HCl. Bylo dosaženo výtěžnosti 84 % což je přibližně o 2 % vyšší výtěžek ve srovnání s výtěžkem uvedeným v příkladu 1.

Příklad 4

V nerezovém fermentačním tanku o objemu 1 000 litrů byla provedena příprava 800 l nesterilní půdy o složení:

1,5 % kukuřičného extraktu (50 % suš.)

1,5 % kyselého hydrolyzátu arašidové mouky

Uvedené procentní koncentrace jsou hmota/objem. Další složení půdy a řízení kultivace bylo stejné jak je uvedeno v příkladu 3.

Kultivace byla ukončena, když koncentrace redukujících látek

klesla k nule, sušina buněk dosáhla hodnoty 6,9 g/litr a hodnota pH činila 4,7.

Biotransformace byla provedena způsobem popsáním v příkladu 2 s tím rozdílem, že teplota při biotransformaci se pohybovala v rozmezí 26 až 28 °C. Biotransformace byla ukončena ve 13. hodině. Bylo dosaženo produkce 1 040 mg/100 ml. tj. při objemu fermentované půdy 820 litrů bylo získáno 8,53 kg D-(-)-FAM při spotřebě benzaldehydu 1,18 kg a sacharózy 6,4 kg na 1 kg D-(-)-FAM, čímž bylo dosaženo úspory cukru 0,6 kg na 1 kg D-(-)-FAM ve srovnání se spotřebou cukru uvedenou v příkladu 1.

Příklad 5

V nerezovém fermentačním tanku o objemu 1 000 litrů byla provedena příprava 800 litrů nesterilní půdy o složení uvedeném v příkladu 1 s tím rozdílem, že počáteční koncentrace sacharózy činila 2 % vztaženo na objem fermentované půdy.

Kultivace byla řízena stejným způsobem jak je uvedeno v příkladu 3. Kultivace byla ukončena, když koncentrace redukujících látek klesla k nule, sušina buněk dosáhla hodnoty 5,2 g/litr a hodnota pH činila 4,9. Biotransformace byla provedena postupem uvedeným v příkladu 4 a ukončena v 16. hodině.

Bylo dosaženo produkce 1 020 mg/100 ml, tj. při objemu fermentované půdy 840 litrů bylo získáno 8,57 kg D-(-)-FAM při spotřebě benzaldehydu 1,17 kg a sacharózy 5,3 kg na 1 kg D-(-)-FAM. Zásahy v dávkování sacharózy při kultivaci a během biotransformace došlo k úspoře 1,3 kg sacharózy vztaženo na 1 kg vytvořeného D-(-)-FAM ve srovnání se spotřebou sacharózy uvedenou v příkladu 1.

Příklad 6

V nerezovém fermentačním tanku o objemu 1 000 litrů byla provedena příprava 800 litrů nesterilní živné půdy o složení jak je uvedeno v příkladu 3. Ostatní složky živné půdy byly shodné

jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že počáteční koncentrace zkvasitelného uhlohydrátu ve fermentační půdě činila 2,5 % (hmota/objem). Jako náhrada sacharózy byla použita těžká cukerná šťáva. Množství těžké šťávy bylo přepočítáno tak, aby obsah zkvasitelného uhlohydrátu ve fermentační půdě činil 2,5 %. Řízení kultivace bylo shodné jak je uvedeno v příkladu 3. Kultivace byla ukončena, když koncentrace redukujících látek klesla k nule, sušina buněk dosáhla hodnoty 6,0 g/l a hodnota pH činila 4,7.

Biotransformace byla provedena způsobem uvedeným v příkladu 3 s tím rozdílem, že na místo sacharózy byla dávkována těžká cukerná šťáva v přepočítaných množstvích vztaženo na sacharózu rovněž jak je uvedeno v příkladu 3 a biotransformace byla ukončena ve 14. hodině.

Bylo dosaženo produkce 1 030 mg D-(-)-FAM/100 ml, tj. při objemu fermentované půdy 870 litrů bylo získáno 8,96 kg D-(-)-FAM při spotřebě benzaldehydu 1,18 kg a zkvasitelného uhlohydrátu, přepočteno na sacharózu, 6,4 kg na 1 kg D-(-)-FAM.

Příklad 7

V nerezovém fermentačním tanku o objemu 1 000 litrů byla provedena příprava 800 litrů nesterilní půdy o složení:

1,5 % kukuřičného extraktu (50 % suš.)

2,0 % hydrolyzátu kvasnic (12 % suš.)

Uvedené procentní koncentrace jsou hmota/objem. Ostatní složení živné půdy bylo shodné jak je uvedeno v příkladu 1. Kvasničný hydrolyzát byl připraven ze zahuštěné suspence kvasnic po ukončené předchozí šarži výroby D-(-)-FAM, tj. po biotransformaci, kyselou hydrolyzou za zvýšeného tlaku a teploty a následující neutralizací. Řízení kultivace bylo shodné jako v příkladu 3.

Kultivace byla ukončena, když koncentrace redukujících látek klesla k nule, sušina buněk dosáhla hodnoty 6,3 g/litr a hodnota pH činila 4,8. Biotransformace byla provedena způsobem uvedeným v příkladu 3 a byla ukončena v 16 hodině.

Bylo dosaženo produkce 1 040 mg/100 ml D-(-)-FAM, tj. při objemu fermentační pŕdy 820 litrů bylo získáno 8,53 kg D-(-)-FAM při spotřebě benzaldehydu 1,21 kg a sacharózy 6,9 kg na 1 kg D-(-)-FAM.

Příklad 8

V nerezovém fermentačním tanku o objemu 1 000 litrů bylo připraveno 800 litrů nesterilní živné pŕdy o složení jak je uvedeno v příkladu 1 s tím rozdílem, že sacharóza byla nahrazena zahuštěnými matečnými louhy po výrobě glukózy ze sacharózy, tj. zahuštěný fruktózový sirup v takovém množství, aby koncentrace zkvasitelných uhlohydrátů odpovídala 3 % (hmota/objem) sacharózy.

Dávkování, kultivace a její řízení bylo provedeno jak je uvedeno v příkladu 3. Kultivace byla ukončena, když koncentrace redukujících látek činila 1 mg/ml, sušina buněk dosáhla hodnoty 6,5 g/litr a hodnota pH byla 4,7, koncentrace ethanolu činila 0,5 % hmota/objem.

Navození změny metabolického stavu kultury před zahájením biotransformace bylo provedeno snížením vzdušnění na 80 litrů/min., přidavkem fruktózového sirupu v takovém množství, aby koncentrace zkvasitelného uhlohydrátu v pŕdě činila 2,5 % a časovou prodlevou 45 minut před přidáním první dávky benzaldehydu.

Biotransformace byla řízena způsobem uvedeným v příkladu 1 a 3 s tím rozdílem, že na místo sacharózy byly dávkovány zahuštěné matečné louhy po výrobě glukózy ze sacharózy v takovém množství, aby koncentrace redukujících látek během biotransformace se pohybovala v rozmezí 10 až 15 mg/ml.

V průběhu biotransformace, v 11. hodině, bylo zvýšeno vzdušnění ze 16 litrů na 320 litrů/min. a biotransformace ukončena v 17. hodině.

Bylo dosaženo produkce 1 240 mg D-(-)-FAM/100 ml, tj. při objemu fermentované pŕdy 850 litrů bylo získáno 10,54 kg D-(-)-FAM při spotřebě benzaldehydu 1,16 kg a zkvasitelného uhlohydrátu přepočteno na sacharózu 7,1 kg vztaženo na 1 kg D-(-)-FAM.

1. Způsob ekonomizace výroby D-(-)-1-fenyl-1-hydroxy-2-propanonu pro přípravu L-(-)-efedrinu biotransformací benzaldehydu enzymovým systémem mikroorganismů, zejména kvasinek rodu *Saccharomyces*, v tekutém mediu s obsahem zdrojů asimilovatelného uhlíku a dusíku, za submersních podmínek, vyznačující se tím, že se v první fázi kultivuje produkční mikroorganismus v živné půdě obsahující výhradně organický zdroj asimilovatelného dusíku, v množství 0,5 až 1,5, s výhodou 0,8 až 1,2 g/litr půdy, za teploty 18 až 30 °C, s výhodou 20 až 22 °C, zdroj asimilovatelného uhlíku, zejména glukózu nebo sacharózu, v množství 10 až 50, s výhodou 20 až 30 mg/litr půdy, za vzdušnění 0,1 až 0,7, s výhodou 0,4 až 0,5 obj. vzduchu /obj. půdy/min., po ukončení růstové fáze mikroorganismu ve fermentačním tanku se v druhé fázi po přidavku zdroje asimilovatelného uhlíku v množství 10 až 30, s výhodou 15 až 20 mg/litr, upraví vzdušnění na 1/2 až 1/4 úrovně v první fázi, po přechodu metabolického stavu kultury směrem k anaerobióze se po době 10 až 60 minut, s výhodou po době 15 až 30 minut, zahájí biotransformace přidáváním benzaldehydu ve více dávkách, za současného dávkování zdroje asimilovatelného uhlíku v množství 2 až 15, s výhodou 4 až 12 mg/ml a za současné úpravy vzdušnění na 0,1 až 0,5 obj. vzduchu/obj. půdy/min., načež se po ukončení biotransformace oddělí biomasa a ze supernatantu se izoluje D-(-)-1-fenyl-1-hydroxy-2-propanon extrakcí organickým, s vodou nemísitelným rozpouštědlem, například octanem butylnatým.
2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se jako zdroje asimilovatelného uhlíku používá glukózy nebo sacharózy čisté nebo technické, meziproductů nebo odpadních productů z výroby sacharózy nebo z výroby glukózy ze sacharózy nebo škrobu, dále syrovátky nebo odpadní máčecí vody z brambor.
3. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se jako organického zdroje asimilovatelného dusíku používá kukuřičného extraktu a/nebo hydrolyzátu bílkovinných surovin rostlinného, živočiš-

ného nebo mikrobiálního původu, s výhodou směsí kukuřičného extraktu s bílkovinným hydrolyzátem nebo s hydrolyzátem či autolyzátem buněk produkčního mikroorganismu, separovaných po biotransformaci benzaldehydu na D-(-)-FAM z předchozí šarže.