

Výroba fenylacetylkarbinolu a efedrinu - méně známá oblast použití kvasinek v průmyslu

663.15:547.586.2

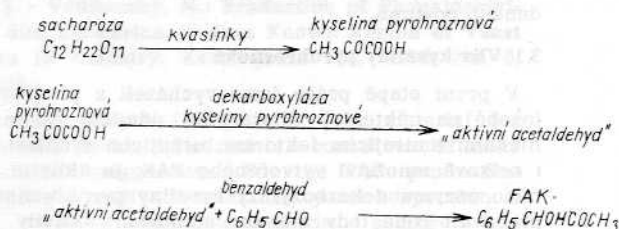
RNDr. JIŘÍ NETRVAL, Ing. MILAN VODŇANSKÝ, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

1. ÚVOD

Fenylacetylkarbinol [D-(–)fenylacetylmetanol, dále FAK] je výchozí surovinou pro výrobu L-(–)efedrinu. Efedrin, který patří mezi alkaloidy, je důležitou složkou různých farmaceutických preparátů. Svým účinkem se řadí mezi tzv. sympathomimetica; zejména vyvolává zvýšení krevního tlaku a působí též na dýchací centrum. V přírodě se efedrin vyskytuje mj. ve vyšších rostlinách z rodu *Ephedra*; jedná se zpravidla o rostliny keřovitého vzrůstu, se kterými se setkáváme především v teplejších oblastech. Izolace efedrinu z některých druhů těchto rostlin představuje nejjednodušší způsob získání této látky. V některých zemích, kde se rostliny z rodu *Ephedra* v dostatečném množství vyskytují v přírodě, mj. i v SSSR, se efedrin získává tímto způsobem ve značném rozsahu. Byly též vypracovány různé způsoby syntetické výroby efedrinu; získává se však při nich efedrin racemický, který je nutno dělit na optické izomery, neboť pouze levotočivá forma je farmakologicky aktivní.

Ve 30. letech tohoto století byl v Německu a v USA objeven nový postup výroby efedrinu, při kterém vzniká přímo levotočivá forma. Tento postup je založen na zjištění *Neuberga* a jeho spolupracovníků (*Neuberg* a *Liebermann*, 1921; *Neuberg* a *Hirsch*, 1922; *Neuberg* a *Ohle*, 1922), že po přidání benzaldehydu k buňkám kva-

sinek v přítomnosti fermentovatelných cukrů vzniká FAK, což je látka, z níž lze již poměrně snadno vyrobit levotočivou formu efedrinu. Přesný mechanismus vzniku FAK zůstal dosti dlouho nejasný; předpokládala se účast zvláštního enzymu, „karboligázy“. Další podstatný pokrok znamenala teprve práce *Hanče* a *Kakáče* (1956). Tito autoři prokázali, že kyselina pyrohroznová, vznikající při fermentaci cukrů, je dekarboxylována dekarboxylázou kyseliny pyrohroznové na „aktivní acetaldehyd“ (acetaldehyd vázaný na thiamindifosfát), z něhož vzniká FAK reakcí s externě dodaným benzaldehydem. Celý proces je možno velmi zjednodušeně znázornit takto:



Optimalizací podmínek pro produkci FAK se zabývala řada autorů. *Bečvářová et al.* (1963) studovali vliv benzaldehydu, přidávaného samostatně nebo v kombinaci

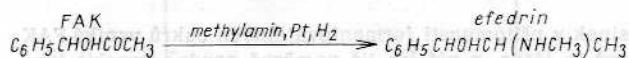
s acetaldehydem, na produkci FAK u *Saccharomyces cerevisiae*. Zjistili, že přídavek acetaldehydu má na produkci FAK pozitivní vliv. Gröger *et al.* (1966) dosahovali na půdě, obsahující třtinovou melasu a minerální soli, produkce FAK 5 mg/ml; přídavek pivovarské sladiny umožnil zvýšení produkce na 8 mg/ml. Voets *et al.* (1973) se mj. zabývali vlivem aerace na produkci FAK u *Saccharomyces cerevisiae*. Zjistili, že je třeba dodržovat určitou optimální intenzitu aerace; v kulturách vzdušných příliš intenzivně nebo naopak vůbec nevzdušněných je produkce FAK snížena. Průběh produkce FAK byl značně rozdílný v třepaných kulturách a ve fermentorech. Uvedení autoři dosahovali produkce FAK kolem 5 mg/ml. Gupta *et al.* (1979) zjišťovali produkci FAK u několika druhů kvasinek; jako nejlepší producent byl určen jeden z kmenů *Saccharomyces cerevisiae*. U tohoto kmene pak zjišťovali vliv velikosti inokula, pH a koncentrace některých organických látek na produkci FAK. Dosahovali produkce FAK rovněž kolem 5 mg/ml.

2. OBECNÉ PRINCIPY VÝROBNÍHO POSTUPU

Postup při výrobě FAK a efedrinu bývá tento: Ve fermentačním tanku se připraví suspenze kvasnic ve vodě. Používají se tekuté odpadní kvasnice ze spilky. Optimální je použití lisovaných kvasnic. (Z tekutých kvasnic, které jsou při nevhodném skladování za vyšších teplot částečně lyzované, se do fermentované půdy zanášejí balastní látky z lyzovaných buněk i ze zbytků piva. Tyto látky pak přecházejí i do organického rozpouštědla a snižují výtěžek FAK při extrakci zvýšenou tvorbou emulzí a rovněž snížení výtěžku efedrinu tím, že způsobují otravu katalyzátoru.)

Do suspenze kvasnic se postupně vnáší dávky benzaldehydu, sacharózy a acetaldehydu, který slouží jako akceptor vodíku, tak dlouho, dokud není enzymový systém kvasinek inhibován benzaldehydem, vedlejšími produkty vznikajícími při biotransformaci i samotným FAK.

FAK, který je ve vodě nerozpustný, je v půdě přítomen ve formě jemné emulze. Po odseparování kvasnic se extrahuje do organického rozpouštědla nemísitelného s vodou. Organická fáze se ve vakuu zahustí asi na 20 % původního objemu. Zahuštěný roztok se podrobí reduktivní aminaci za přítomnosti methylaminu a speciálního katalyzátoru na bázi platiny při nízkém tlaku vodíku.



Po odseparování katalyzátoru se vzniklá báze efedrinu převede na hydrochlorid efedrinu rozpustný ve vodě, vodná fáze se vakuově zahustí a podrobí krystalizaci. Krystaly L-efedrinu slouží potom jako substance pro přípravu různých léků.

3. STRUČNÝ PŘEHLED NĚKTERÝCH NOVÝCH POZNATKŮ O PRODUKCI FAK

Zabývali jsme se možnostmi dalšího zdokonalení uvedeného postupu.

3.1 Vliv kyseliny pyrohroznové

V první etapě práce jsme vycházeli z představy, založené na některých literárních údajích, podle které hlavním limitujícím faktorem, určujícím rychlost tvorby i celkové množství vytvořeného FAK, je aktivita zmíněného enzymu dekarboxylázy kyseliny pyrohroznové. Vypracovali jsme tedy metodu stanovení aktivity tohoto enzymu v buňkách kvasinek. Zjistili jsme, že aktivitu dekarboxylázy kyseliny pyrohroznové, stejně jako produkci FAK, je možno ovlivnit přídavky kukuřičného extraktu nebo kvasničného hydrolyzátu. V laboratorních

fermentorech o objemu 1 l jsme pak za použití odpadních pivovarských kvasnic zjišťovali závislost mezi aktivitou dekarboxylázy kyseliny pyrohroznové a produkcí FAK. Uvedená představa o úloze dekarboxylázy kyseliny pyrohroznové však nebyla potvrzena. Naopak, nejvyšší rychlost tvorby i nejvyšší celkové množství vytvořeného FAK bylo zjištěno u buněk, které vykazovaly nejnižší aktivity uvedeného enzymu.

Vytvořili jsme tedy jinou hypotézu, podle které množství vytvořeného FAK závisí především na intracelulární koncentraci kyseliny pyrohroznové. Tuto představu jsme se pokusili experimentálně ověřit. Ve dvou laboratorních fermentorech o objemu 1 l byl nejprve po dobu 6 h proveden rozkvas. Bylo použito půdy o složení: 0,56 % $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,19 % $(NH_4)_2 SO_4$, 0,06 % KH_2PO_4 , 0,05 % $NH_4H_2PO_4$, 2 % kukuřičného extraktu a 1 % kvasničného hydrolyzátu; pH bylo upraveno na 6,0. V průběhu rozkvasu bylo postupně přidáno celkem 15 % sacharózy. Půda obsahovala 8,3 % vlhké váhy buněk. Pak byla v obou fermentorech prováděna biotransformace analogickým způsobem, jako při výrobním postupu; do jednoho z fermentorů byla však současně přidávána kyselina pyrohroznová v celkovém množství 8,5 %. Jak ukazuje tab. 1, za přítomnosti kyseliny pyrohroznové bylo skutečně dosaženo vyšší produkce FAK. Tento výsledek sice nelze pokládat za nesporný důkaz správnosti zmíněné hypotézy, nepochybně však představuje argument v její prospěch.

Tabulka 1. Vliv přídavku kyseliny pyrohroznové na produkci FAK u *Saccharomyces carlsbergensis* po 5 a 7,5 h biotransformace

Přídavek kyseliny pyrohroznové	Produkce FAK po 5 h (mg/ml)	Produkce FAK po 7,5 h (mg/ml)
—	6,72	7,82
8,5 %	7,20	10,16

Tabulka 2. Produkce FAK u různých kmenů kvasinek po 30 min biotransformace

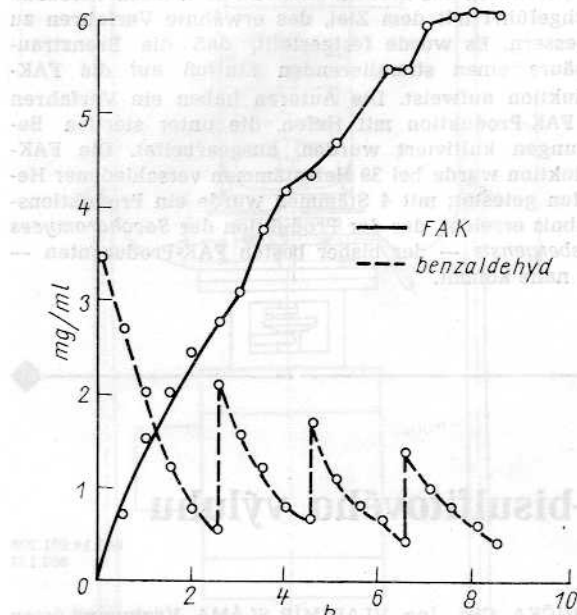
Produkce FAK (mg/ml)	0	0,01—0,4	0,4—0,7	0,7
Počet kmenů kvasinek	12	7	4	16

3.2 Biotransformace za použití sterilně propagovaných kvasinek

Při dosud uvedených pokusech bylo používáno odpadních pivovarských kvasnic. Používání odpadních pivovarských kvasnic, i když se zdá být ekonomicky výhodné, má však také jeden negativní rys, projevující se jak při výrobě, tak i při experimentální práci: téměř nevyhnutelně vznikají značné výkyvy v produkci FAK v závislosti na kvalitě použitých kvasnic. Ta bývá bohužel velmi proměnlivá a liší se jak podle pivovaru, ze kterého kvasnice pocházejí, tak i podle roční doby (nepříznivý vliv vysokých teplot v letním období). Snaha o zlepšení reprodukovatelnosti produkce FAK modifikací podmínek rozkvasu nebyla příliš úspěšná. Proto jsme se pokusili vypracovat postup, při kterém by se pracovalo s kvasinkami, kultivovanými za sterilních nebo semisterilních podmínek na našem pracovišti.

Nejprve jsme vypracovali postup sterilní kultivace kvasinek kmene *Saccharomyces carlsbergensis* „Budvar“ v baňkách o objemu 500 ml. Baňky byly plněny 150 ml půdy, která obsahovala minerální soli ve stejných kon-

centracích, jako půda popsaná v předchozí kapitole, 3 % sacharózy a 5 % kukuřičného extraktu (pH upraveno na 6,0). Naočkované baňky byly kultivovány při 29 °C na rotačním třepacím stroji po dobu 24 h; pak byla kultura přeočkována (1 % inokula) do 2. generace, ve které kultivace pokračovala dalších 24 h za týchž podmínek. Pak byla v baňkách prováděna biotransformace benzaldehydu; její průběh ukazuje obr. 1.



Obr. 1. Biotransformace benzaldehydu na FAK kulturou *Saccharomyces carlsbergensis* „Budvar“.

3.3 Produkce FAK u různých druhů kvasinek

Při použití metodiky, popsané v předchozím odstavci, jsme se pokusili zjistit, zda některé druhy kvasinek nevykazují vyšší produkci FAK než *Saccharomyces carlsbergensis*. Nejprve jsme u 39 testovaných kmenů zjišťovali produkci FAK ve 30. min po zahájení biotransformace. Ukázalo se, že v produkci FAK existuje u kvasinek variabilita značně širokého rozsahu. Pro přehlednost byly kmény arbitrárně rozděleny do 4 kategorií: I. produkce nulová, II. nízká (0,01–0,4 mg/ml), III. střední (0,41–0,7 mg/ml) a IV. vysoká (více než 0,7 mg/ml FAK) — viz tab. 2. Není bez zajímavosti, že většina testovaných kmenů spadá do I. nebo IV. kategorie, tj. vykazuje buď nulovou, nebo relativně vysokou produkci FAK, zatímco kmenů s nízkou a střední produkcí je poměrně málo. Kmeny s relativně vysokou produkcí FAK náležely do rodů *Saccharomyces*, *Candida* a *Hansenula*. U kmenů, které ve 30. min vykazovaly relativně vysokou produkci FAK, se nyní provádí celá biotransformace. U 4 kmenů, náležejících do rodů *Saccharomyces*, *Candida* a *Hansenula*, bylo dosaženo produkce FAK, blízké se produkci u *Saccharomyces carlsbergensis*; snaha o nalezení kmene s vyšší produkcí pokračuje.

Literatura

- [1] BEČVÁŘOVÁ H., HANČ O., MACEK K.: *Folia Microbiol.* **8**, 1963, s. 185
- [2] GRÖGER D., SCHMAUDER H. P., MOTHES K.: *Z. Allg. Mikrobiol.* **6**, 1966, s. 275
- [3] GUPTA K G., SINGH J., SAHNI G., DHAWAN S.: *Biotechnol. Bioeng.* **21**, 1979, s. 1085
- [4] HANČ O., KAKÁČ B.: *Naturwiss.* **43**, 1956, s. 498
- [5] NEUBERG C., HIRSCH J.: *Biochem. Z.* **115**, 1921, s. 282
- [6] NEUBERG C., LIEBERMANN L.: *Biochem. Z.* **121**, 1921, s. 311

[7] NEUBERG C., OHLE H.: *Biochem. Z.* **127**, 1922, s. 327

[8] VOETS J. P., VANDAMME E. J., VLERICK C.: *Z. Allg. Mikrobiol.* **13**, 1973, s. 355

Netrval, J. - Vodňanský, M.: Výroba fenylacetylkarbinolu a efedrinu — méně známá oblast použití kvasinek v průmyslu. *Kvas. prům.*, **28**, 1982, č. 6, s. 131–134.

Fenylacetylkarbinol (FAK) je výchozí surovinou pro výrobu efedrinu, který je složkou různých farmaceutických preparátů. Při výrobě FAK se používá odpadních pivovarských kvasnic. Do suspenze kvasnic se postupně vnáší dávky benzaldehydu, sacharózy a acetaldehydu, který slouží jako akceptor vodíku, tak dlouho, dokud se nezastaví biotransformace inhibicí enzymového systému. Vytvořený FAK se extrahuje do organického rozpouštědla; po jeho zahuštění se provádí redukční aminace za přítomnosti methylaminu a speciálního katalyzátoru na bázi platiny při nízkém tlaku vodíku, čímž vzniká efedrin. Byly prováděny experimenty s cílem zdokonalit uvedený postup. Zjistilo se, že kyselina pyrohroznová má stimulační vliv na produkci FAK. Byl vypracován postup produkce FAK kvasinkami, kultivovanými za sterilních podmínek. Byla testována produkce FAK u 39 kmenů různých druhů kvasinek; u 4 kmenů bylo dosaženo produkce, blízké se produkci u druhu *Saccharomyces carlsbergensis*, který se zatím jeví jako nejlepší producent FAK.

Netrval, I., Vodнянски, M.: Производство фенилацетилкарбинола и эфедрин — менее известная область применения дрожжей в промышленности. *Квас. прум.*, **28**, 1982, No. 6, стр. 131–134.

Фенилацетилкарбинол (ФАК) является исходным сырьем для производства эфедрин, являющегося компонентой разных фармацевтических препаратов. При производстве ФАК применяются отработанные пивоварные дрожжи. Во взвесь дрожжей постепенно вносятся дозы бензальдегида, сахарозы и ацетальдегида, который служит акцептором водорода до момента, пока не прекращается биотрансформация ингибированием энзимной системы. Образовавшийся ФАК экстрагируется в органический растворитель; после его сгущения проводится редуцированное аминирование в присутствии метиламина и специального катализатора на базе платины при низком давлении водорода, причем возникает эфедрин. Проводились эксперименты с целью усовершенствования приведенного процесса. Было установлено, что пировиноградная кислота оказывает стимулирующее влияние на продукцию ФАК. Был разработан способ продукции ФАК при помощи дрожжей, культивируемых в стерильных условиях. Было проведено испытание продукции ФАК для 39 штаммов разных видов дрожжей; с четырьмя штаммами было достигнуто продукция, приближающейся к продукции с применением расы *Saccharomyces carlsbergensis*, являющейся пока лучшим продуцентом фенилацетилкарбинола.

Netrval, J. - Vodňanský, M.: Production of Phenylacetylcarbinol and Ephedrine — Less Known Region of Yeast Utilization in Industry. *Kvas. prům.* **28**, 1982, No. 6, p. 131–134

Phenylacetylcarbinol (PAC) is a base material for ephedrine production. Ephedrine is a constituent of many pharmaceutical preparations. For the PAC production waste brewer's yeast are used. The yeast suspension is supplied stepwise by benzaldehyde, sucrose and acetaldehyde where the last compound serves as a hydrogen acceptor, as long as the biotransformation is stopped due to the inhibition of the enzyme system. PAC formed is then extracted into the organic solvent.

After its thickening the reduction in presence of methylamine and a special catalyst on a base of platinum under low hydrogen pressure is performed. The aim of experiments made was to improve the described procedure. It was found that pyruvic acid has a stimulative effect on the PAC production. The procedure of the PAC production by yeast under sterile conditions was elaborated. The PAC production was tested with 39 strains of various species of yeasts. With 4 yeast strains the production of PAC achieved was almost as high as that achieved with the strain *Saccharomyces carlsbergensis* which has been considered as the best producer up to now.

Netrval, J. - Vodňanský, M.: Die Herstellung von Fenylacetylkarbinol und Efedrin — ein weniger bekanntes Gebiet der industriellen Hefenanwendung. Kvas. prům. 28, 1982, No. 6, S. 131—134.

Das Fenylacetylkarbinol (FAK) ist der Ausgangsstoff für die Produktion des Efedrins, des Bestandteils verschiedener pharmazeutischer Präparate. Bei der FAK-Produktion wird die Abfallhefe aus Brauereien ausge-

nützt. In die Hefesuspension werden Benzaldehyd, Saccharose und Acetaldehyd, das als Wasserstoffakzeptor dient, dosiert, und zwar so lange, bis die Biotransformation durch die Inhibition des Enzymsystems zum Abschluß gebracht wird. Das entstandene FAK wird in ein organisches Lösungsmittel extrahiert; nach seiner Eindickung wird die reduktive Animation bei Anwesenheit von Methylamin und eines speziellen Katalysators auf Platinbasis bei niedrigem Wasserstoffdruck durchgeführt, wodurch das Efedrin entsteht. Es wurden Versuche durchgeführt mit dem Ziel, das erwähnte Verfahren zu verbessern. Es wurde festgestellt, daß die Brenztraubensäure einen stimulierenden Einfluß auf die FAK-Produktion aufweist. Die Autoren haben ein Verfahren zur FAK-Produktion mit Hefen, die unter sterilen Bedingungen kultiviert wurden, ausgearbeitet. Die FAK-Produktion wurde bei 39 Hefestämmen verschiedener Heferarten getestet; mit 4 Stämmen wurde ein Produktionsergebnis erreicht, das der Produktion der *Saccharomyces carlsbergensis* — der bisher besten FAK-Produzenten — sehr nahe kommt.