



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

263 016

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(11)

(B1)

- (61) Autorské osvědčení závislé na čs. autorském
osvědčení č. 231 656
(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 30 06 87
(21) PV 4910-87.Q

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 11/02

- (40) Zveřejněno 16 08 88
(45) Vydáno 1.3.1990

(75)
Autor vynálezu

PLHÁČKOVÁ KAMILA RNDr., VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc.,
PÍSAŘÍKOVÁ ALEXANDRA RNDr., KRUMPHANZL VLADIMÍR člen korespondent ČSAV,
ZEMAN ROMAN RNDr. CSc., BÁRTA MIROSLAV RNDr., PRAHA
MARTVOŇ AUGUSTIN doc. ing. CSc., BRATISLAVA, WELWARD LADISLAV ing. CSc.,
KREMPOVÁ ALŽBĚTA ing., BANSKÁ BYSTRICA

(54)

Zrnitý biokatalyzátor na bázi imobilizovaného enzymu hydrolázy
7 β -(4-karboxybutanamido) cefalosporánové kyseliny k enzymové
výrobě 7-aminocefalosporánové kyseliny a způsob jeho přípravy

Řešení se týká zrnitého biokatalyzátoru na bázi imobilizovaného enzymu hydrolázy 7 β -(4-karboxybutanamido) cefalosporánové kyseliny k enzymové výrobě 7-aminocefalosporánové kyseliny podle čs. autorského osvědčení č. 231 656 a způsob jeho výroby. Biokatalyzátor je připravitelný na bázi zesíťené hydrolázy 7 β -(4-karboxybutanamido) cefalosporánové kyseliny následným zpracováním vodným roztokem glutaraldehydu a/nebo polyethyleniminu nebo bílkovin mikrobiálního, rostlinného nebo živočišného původu a vodným roztokem glutaraldehydu, separací a mechanickou homogenizací vzniklého produktu a jeho případným parciálním sušením, popřípadě jeho následným suspendováním v ochlazených organických rozpouštědlech neomezeně mísitelných s vodou a/nebo jejich směsí s vodou, opětovnou separací a popřípadě dalším parciálním sušením a konečně jeho promytím vodou nebo pufrem.

Vynález se týká zrnitého biokatalyzátoru na bázi imobilizovaného enzymu hydrolázy 7 β -(4-karboxybutanamido) cefalosporánové kyseliny k enzymové výrobě 7-aminocefalosporánové kyseliny a způsobu jeho přípravy v závislosti na čs. autorském osvědčení č. 231 656.

7 β -(4-karboxibutanamido)cefalosporánová kyselina (dále jen glutaryl-7-ACK) je meziprodukt dvoustupňové přípravy 7-aminocefalosporánové kyseliny (dále jen 7-ACK) z cefalosporinu C. 7-ACK slouží jako farmaceuticky významný meziprodukt pro výrobu polosyntetických cefalosporinů jako je cefalotin a cefazolin.

V patentové literatuře je popsána řada způsobů imobilizace buněk nebo enzymů pro průmyslové biotransformace, využívající nejrůznější nosiče a způsoby imobilizace. Existují též způsoby imobilizace, které nevyžadují použití nosiče vůbec, jako jsou např. univerzální postupy využívající chemicky reaktivních polymerů rozpustných ve vodě pro imobilizaci různých prokaryontních a eukaryontních buněk s různou enzymovou aktivitou (čs. autorské osvědčení č. 231 458). Za použití chemicky reaktivních polymerů ve vodě rozpustných byl vypracován též jednoduchý a univerzální postup výroby imobilizovaných enzymů jako jsou např. hydrolázy, izomerázy, racemázy, lyázy a oxydoreduktázy podle čs. autorského osvědčení č. 231 656. Citovaným postupem lze pomocí reaktivních rozpustných polymerů (dále jen RRP), s výhodou připravitelných reakcí komerčně dostupných flokulantů obsahujících frakci polyethyleniminu s bifunkčním síťovacím činidlem, například glutaraldehydem a rozpustnými preparáty enzymů různé čistoty a kvality, připravit ve vodě nerozpustný enzym, ve formě částic biokatalyzátoru s dobrými sedimentačními vlastnostmi, vysokou filtrabilitou a specifickou aktivitou požadovaného enzymu.

Pro enzymovou hydrolýzu glutaryl-7-ACK na 7-ACK je popsáno kromě nativních buněk s aktivitou hydrolázy 7- β -(4-karboxybutanami-

do) cefalosporánové kyseliny (dále jen hydrolázy glutaryl-7-ACK), rovněž použití biokatalyzátorů na bázi imobilizovaných buněk s touto aktivitou, jako jsou buňky z rodu *Comamonas* či *Pseudomonas* zabudované v celulózoacetátových kapsulích (Japonský patentový spis č. 76 70 884), nebo buňky *Pseudomonas* sp. imobilizované pomocí reaktivních rozpustných polymerů (čs. autorské osvědčení č. 251 111, závislé na čs. autorském osvědčení č. 231 458).

Využití biokatalyzátorů na bázi imobilizovaných technických nebo do různého stupně čistoty izolovaných enzymů je pro přeměnu glutaryl-7-ACK principiálně výhodnější, neboť buňky produkčních kmenů mohou obsahovat další enzymové aktivity nežádoucí z hlediska přípravy 7-ACK, neboť atakují 7-acylcefemsloučeniny jiným a nežádoucím způsobem, jako jsou například esterázy, katalyzující tvorbu deacetylovaných derivátů glutaryl-7-ACK a 7-ACK nebo 3-laktamázy.

V patentové literatuře je popsáno několik způsobů využití hydrolázy glutaryl-7-ACK izolované z kmene rodu *Comamonas* sp. a *Pseudomonas*, zejména *Pseudomonas ovalis*, imobilizované pomocí glutaraldehydu na různé nosiče jako bazický iontoměnič Amberlit Ira-940, nebo kopolymer akrylonitrilu a methakrylátu (Japonské patentové spisy č. 78 59 095, č. 81 85 298 a č. 78 139 791). Všechny tyto způsoby vyžadují však imobilizaci na částice ve vodě nerozpustných nosičů nebo způsoby imobilizace do sítě vznikajícího polymeru, přičemž je známo, že náklady na výrobu imobilizovaných preparátů enzymů jsou výrazně ovlivněny cenou a dostupností použitých nosičů. Další nevýhodou těchto postupů je, že dosahované specifické aktivity získaných imobilizovaných materiálů na bázi tohoto imobilizovaného enzymu jsou velmi nízké a nedovolují reálný předpoklad průmyslové realizace.

Postup podle předmětného vynálezu odstraňuje zmíněné nevýhody, neboť nevyžaduje žádných organických, anorganických či přírodních ve vodě nerozpustných nosičů.

Sítění enzymových molekul hydrolázy glutaryl-7-ACK do formy vzájemně kovalentně prokřížené sítě pomocí běžných síťovacích činidel (glutaraldehyd, toluendiizokyanát apod.) není možné, neboť tento enzym je vysoce citlivý k poměrně agresivním účinkům těchto činidel a dochází i při použití jejich velmi nízkých koncentrací k nevratné inaktivaci tohoto enzymu. Proto, aby nedošlo k inaktivaci tohoto enzymu v průběhu imobilizace, je nutné pracovat s reaktivními, ve vodě rozpustnými polymery, které vznikly například reakcí kationaktivních flokulantů, obsahujících frakci polyethyleniminu s glutaraldehydem odděleně, načež vzniklé částice lze poté dosítit

a zpevnit pulzním přidáním nízkých koncentrací volného glutaraldehydu, nebo přidat ve vodě rozpustnou látku, která vstupuje do reakce s glutaraldehydem, např. polyethylenimin nebo roztok bílkovin a vzniklou směs voluminézních částic spolu s koreagujícími rozpouštěnými látkami kovalentně zesíťit. Při tomto předmětném postupu je pokles aktivity hydrolázy glutaryl-7-ACK podstatně nižší, částice jsou pevnější a vykazují vysokou stabilitu enzymové aktivity.

Předmětem vynálezu tedy je zrnitý biokatalyzátor na bázi imobilizovaného enzymu hydrolázy 7 β -(4-karboxybutanamido) cefalosporánové kyseliny k enzymové výrobě 7-amicefalosporánové kyseliny podle čs. autorského osvědčení 231 656 připravitelný z částic biokatalyzátoru na bázi zesíťené hydrolázy 7 β -(4-karboxybutanamido) cefalosporánové kyseliny následným zpracováním vodným roztokem glutaraldehydu a/nebo polyethyleniminu nebo bílkovin mikrobiálního, rostlinného nebo živočišného původu a vodným roztokem glutaraldehydu, separací a mechanickou homogenizací vzniklého produktu a jeho parciálním sušením, popř. jeho následným suspendováním v ochlazených organických rozpouštědlech neomezeně mísitelných s vodou a/nebo jejich směsmi s vodou, opětovnou separací a parciálním sušením a konečně jeho promytím vodou nebo pufrem.

Podle vynálezu se tento biokatalyzátor vyrábí tak, že se do nepřetržitě míchané reakční směsi částic po úpravě pH v rozmezí hodnot 6,0 až 8,5, s výhodou 7,5, přidá vodný roztok glutaraldehydu v rozmezí jeho koncentrací 0,01 až 1,0 % objem/objem, nebo vodný roztok polyethyleniminu nebo vodný roztok bílkovin a následně vodný roztok glutaraldehydu, znovu se upraví pH reakční směsi v rozmezí uvedených hodnot a reakční směs se nepřetržitě míchá po dobu 10 minut až 5 hodin, nebo se ponechá v klidu, popřípadě se ponechá zmrznout, načež se částice separují, mechanicky homogenizují a parciálně suší, nebo se za míchání ošetří ochlazeným acetonem nebo ethanolem a/nebo jejich směsmi s vodou, znovu separují a parciálně suší po dobu 1 až 24 hodin při teplotě 10 až 40 °C, poté se biokatalyzátor suspenduje ve vodě nebo v pufru, několikrát dekantuje a promyje, ponechá nabobtnat a separuje.

Částice biokatalyzátoru získané podle předmětného postupu mají vysokou sedimentační rychlost, dobrou filtrovatelnost a vysokou aktivitu hydrolázy glutaryl-7-ACK. Tyto vlastnosti a zvláště skutečnost úplné absence nežádoucích enzymových aktivit, dovolují reálný předpoklad jeho využití pro výrobu 7-ACK při těchto jeho přednostech:

a) vyšší stupeň teoretické konverze substrátu na produkt,

- b) vyšší výtěžek 7-ACK v izolaci,
- c) vyšší kvalita 7-ACK,
- d) nepřítomnost degradačních produktů v izolované 7-ACK.

Aktivita hydrolázy glutaryl-7-ACK byla zjišťována měřením rychlosti hydrolýzy glutaryl-7-ACK na 7-ACK v 0,1 M fosfátovém pufru o pH 7,0 při teplotě 37 °C v oblasti enzymové kinetiky nultého řádu. 7-ACK byla stanovena spektrofotometricky za použití p-dimethylaminobenzaldehydu, který reaguje se 7-ACK za vzniku barevné Schiffovy báze podle čs. autorského osvědčení č. 111 959, v modifikaci podle Balasinghama a sp. (Biochim. Biophys. Acta, 276, 250, 1972).

Jedna jednotka enzymové aktivity (U) je takové množství enzymu, které odpovídá tvorbě jednoho μ molu 7-ACK za minutu za výše uvedených podmínek reakce. Specifická aktivita výchozího a imobilizovaného materiálu je vyjadřována jako $U \cdot g^{-1}$ bílkovin resp. suché hmoty.

7-ACK byla v reakční směsi sledována dále chromatograficky za použití tenké vrstvy celulózy (Polygram cell - 300) v systému n-propanol-voda (7:3) s ninhydrinovou detekcí (R_f 0,5) nebo vysokotlakou kapalinovou chromatografií (HPLC).

Vynález je dále doložen v příkladech provedení, aniž by se jimi omezoval.

Příklady provedení

Příklad 1

Jeden litr roztoku technické hydrolázy glutaryl-7-ACK bez aktivity nespecifických esteráz, obsahující 3 g bílkovin $\cdot \text{liter}^{-1}$ a celkové množství 800 U $\cdot \text{liter}^{-1}$ bylo pomalu a po částech přidáváno do nepřetržitě míchané reakční směsi reaktivního rozpustného polymeru (RRP) vzniklého reakcí kationaktivních flokulantů obsahujících frakci polyethyleniminu a glutaraldehydu podle čs. autorského osvědčení č. 231 656.

Po vpravení veškerého množství roztoku enzymu bylo pH reakční směsi v průběhu nepřetržitého míchání upraveno na hodnotu 7,5 20 % vodným roztokem hydroxidu sodného. K vzniklé suspenzi voluminálních částic byl postupně a pomalu přidáván 25 % vodný roztok glutaraldehydu tak, aby jeho výsledná koncentrace v reakční směsi byla 0,5 % (objem/objem). Poté bylo opět uvedeným roztokem a způsobem upraveno pH reakční směsi na hodnotu 7,5 a směs byla míchána po dobu jedné hodiny.

Poté byly částice odděleny filtrací, vlhký voluminězní koláč byl vpraven do kuchyňského robotu na strouhanou housku, jehož buben byl opatřen řeznými otvory 0,5 až 1 mm. Homogenizovaný materiál ve formě granulí byl suspendován do směsi ethanol : voda (1:2) při teplotě -5°C , krátce promíchán pomocí rychloběžného vrtulového míchadla, ihned a ostře vakuově odsát a částice sušeny ve vakuové sušárně při teplotě 30°C po dobu 2 hodin. Poté byl materiál suspendován v pitné vodě, několikrát vodou dekantován, přičemž poslední dekantace byly prováděny destilovanou vodou. Promyté částice byly separovány vakuovou filtrací.

Bylo získáno 29,5 g vlhké hmoty biokatalyzátoru o sušině 22,5 % a specifické aktivitě hydrolázy glutaryl-7-ACK $60,2 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$.

2 g glutaryl-7-ACK (čistota 95,4 %) bylo rozpuštěno za úpravy pH 1 N roztokem NaOH na hodnotu pH 7,0 v 90 ml 0,05 M fosfátovém pufru o pH 7,0 a přidáno 10 g vlhké hmoty získaného biokatalyzátoru a směs byla míchána při teplotě 35°C za kontinuální úpravy pH roztokem alkálie na hodnotu 7,0 po dobu 60 minut. Bylo dosaženo 90 % teoretické konverze substrátu na 7-ACK. Popsaný postup byl opakován celkem 5 x vždy se stejnou zásadou částic téhož biokatalyzátoru a průměrný stupeň konverze substrátu na 7-ACK/5 cyklů opakovaného použití činil 89,3 %.

Příklad 2

Jeden litr roztoku technického enzymu byl smíchán s 0,8 litry RRP stejným způsobem jako v příkladu 1. Roztok technického enzymu vykazoval stejnou aktivitu a koncentraci bílkovin. Poté bylo přidáno v průběhu nepřetržitého míchání 10 ml 10 % vodného roztoku polyethyleniminu s molekulovou hmotností 30 000 až 40 000, pH bylo upraveno na hodnotu 7,5 20 % vodným roztokem NaOH, přidán vodný roztok glutaraldehydu tak, aby výsledná koncentrace v reakční směsi činila 0,5 % a pH bylo opět upraveno popsáním způsobem. Další postup přípravy biokatalyzátoru byl stejný jak je uvedeno v příkladu 1.

Bylo získáno 32,2 g vlhké hmoty biokatalyzátoru o sušině 23,8 % a specifické aktivitě hydrolázy glutaryl-7-ACK $53,3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$.

Dále byla provedena enzymová konverze substrátu na produkt za podmínek a způsobem uvedeným v příkladu 1 s tím rozdílem, že namísto fosfátového pufru bylo k rozpuštění substrátu použito destilované vody. Bylo dosaženo 87,3 % teoretické konverze glutaryl-7-ACK, průměrný stupeň konverze v 5 opakováních cyklech použití téže násady biokatalyzátoru činil 86,3 % teorie.

Byl smíchán jeden litr roztoku technického enzymu stejných kvalit a stejným způsobem jako v příkladu 1 s RRP. K reakční směsi byl navíc přidán vodný roztok bílkovin (technická vaječná bílkovina) tak, aby výsledná koncentrace celkových bílkovin činila $50 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$. Po vpravení roztoku bílkovin bylo pH v průběhu nepřetržitého míchání upraveno popsáním způsobem a ke vzniklé suspenzi částic byl přidán 25 % vodný roztok glutaraldehydu tak, aby jeho aktuální koncentrace v reakční směsi byla 1 % (objem/objem). Dále byl postup přípravy biokatalyzátoru stejný jako v příkladu 1.

Bylo získáno 70,3 g vlhké hmoty biokatalyzátoru o sušině 24,3 % a specifické aktivitě hydrolázy glutaryl-7-ACK $29,8 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$.

Příklad 4

Byl připraven biokatalyzátor stejným způsobem jak je uvedeno v příkladu 2 s tím rozdílem, že jako výchozí enzymový materiál byl použit roztok technické hydrolázy glutaryl-7-ACK bez aktivity nespecifických esteráz, získaný zahuštěním na rotačním vakuové odpařovači při teplotě 38°C , obsahující 30 g bílkovin $\cdot \text{lit}^{-1}$ a celkovém množství tohoto enzymu $7\,100 \text{ U} \cdot \text{lit}^{-1}$. Bylo získáno 56,4 g vlhké hmoty biokatalyzátoru o sušině 24 % a specifické aktivitě hydrolázy glutaryl-7-ACK $314,7 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$.

Příklad 5

Jeden litr roztoku technického enzymu, který byl zahuštěn způsobem popsáním v příkladu 4, byl smíchán s RRP způsobem jako v příkladu 1; pH reakční směsi bylo v průběhu nepřetržitého míchání upraveno popsáním způsobem na hodnotu 7,8, směs byla důkladně homogenizována a poté mražena v tenké vrstvě při -20°C po dobu 5 hodin. Poté byla směs rozmražena, částice suspendovány do 0,1 % vodného roztoku glutaraldehydu a po 30 minutách míchání při teplotě místnosti byla suspenze zředěna destilovanou vodou a částice separovány vakuovou filtrací. Vlhký voluminózní koláč byl mechanicky homogenizován a sušen při 30°C 3 hodiny za vakua. Poté byly částice suspendovány v destilované vodě, dekantovány, promyty a separovány způsobem uvedeným v příkladu 1.

Bylo získáno 55,3 g vlhké hmoty biokatalyzátoru o sušině 24,6 % a specifické aktivitě hydrolázy glutaryl-7-ACK $307 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$.

Příklad 6

263 016

Jeden litr vodného roztoku technické hydrolázy, který byl zahuštěn způsobem popsaným v příkladu 4, obsahující koncentraci bílkovin a aktivitu, která je rovněž uvedena v příkladu 4, byl smíchán s RRP způsobem uvedeným v příkladu 1 včetně způsobu úpravy pH. K vzniklé suspenzi voluminézních částic byl postupně přidán 25 % vodný roztok glutaraldehydu tak, aby jeho výsledná koncentrace v reakční směsi byla 0,25 % (objem/objem). Dále bylo postupováno v imobilizaci postupem uvedeným v příkladu 5.

Bylo získáno 55,5 g vlhké hmoty biokatalyzátoru o sušině 24,6 % a specifické aktivitě hydrolázy glutaryl-7-ACK 312 U . g⁻¹.

Příklad 7

Bylo smícháno 950 ml roztoku technického enzymu stejných kvalit a stejným způsobem s RRP jako v příkladu 1. Dále bylo v imobilizaci postupováno stejným způsobem jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že pH reakční směsi bylo upraveno na hodnotu 7,0, aktuální koncentrace přidaného roztoku glutaraldehydu činila 0,05 % (objem/objem). Dále bylo v imobilizaci pokračováno mražením reakční směsi způsobem uvedeným v příkladu 5, včetně dekantace, promytí a separace.

Bylo získáno 26,4 g vlhké hmoty biokatalyzátoru o sušině 22,8 % a specifické aktivitě hydrolázy glutaryl-7-ACK 70 U . g⁻¹.

1. Zrnitý biokatalyzátor na bázi imobilizovaného enzymu hydrolázy $7/\beta$ -(4-karboxybutanamido) cefalosporánové kyseliny k enzymové výrobě 7-aminocefalosporánové kyseliny podle čs. autorského osvědčení č. 231 656 připravitelný z částic biokatalyzátoru na bázi zesítné hydrolázy $7/\beta$ -(4-karboxybutanamido) cefalosporánové kyseliny následným zpracováním vodným roztokem glutaraldehydu a/nebo polyethyleniminu nebo bílkovin mikrobiálního, rostlinného nebo živočišného původu a vodným roztokem glutaraldehydu, separací a mechanickou homogenizací vzniklého produktu a jeho parciálním sušením, popřípadě jeho následným suspendováním v ochlazených organických rozpouštědlech neomezeně mísitelných s vodou a/nebo jejich směsmi s vodou, opětovnou separací a popřípadě dalším parciálním sušením a konečně jeho promytím vodou nebo pufrem.
2. Způsob výroby biokatalyzátoru podle bodu 1, vyznačený tím, že do nepřetržitě míchané reakční směsi částic se po úpravě pH v rozmezí hodnot 6,0 až 8,5, s výhodou 7,5 přidá vodný roztok glutaraldehydu v rozmezí jeho koncentrací 0,01 až 1,0 % objem/objem, nebo vodný roztok polyethyleniminu nebo vodný roztok bílkovin a následně vodný roztok glutaraldehydu, znovu se upraví pH reakční směsi v rozmezí uvedených hodnot a reakční směs se nepřetržitě míchá po dobu 10 minut až 5 hodin, nebo se ponechá v klidu, popřípadě se nechá zmraznout, načež se částice separují, mechanicky homogenizují a popřípadě suší, nebo se za míchání ošetří ochlazeným acetonem nebo ethanolem a/nebo jejich směsmi s vodou, znovu separují a popřípadě parciálně suší po dobu jedné až 24 hodin při teplotě 10 až 40 °C, poté se biokatalyzátor suspenduje ve vodě nebo v pufru, několikrát dekantuje a promyje, ponechá nabobtnat a separuje.