

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

291 154

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2001 - 2823

(22) Přihlášeno: 03.08.2001

(40) Zveřejněno: 11.12.2002

(Věstník č. 12/2002)

(47) Uděleno: 29.10.2002

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 11.12.2002
(Věstník č. 12/2002)

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷ :

C 12 N 9/84

C 12 N 1/20

C 12 P 37/00

C 12 P 37/02

(73) Majitel patentu:

MIKROBIOLOGICKÝ ÚSTAV AV ČR, Praha, CZ;

(72) Původce vynálezu:

Piháčková Kamila RNDr. CSc., Praha, CZ;

Kyslík Pavel RNDr. CSc., Praha, CZ;

Bečka Stanislav RNDr. CSc., Praha, CZ;

Sobotková Irma, Praha, CZ;

(54) Název vynálezu:

**Kmen mikroorganismu Comamonas testosteroni
CCM 4824**

(57) Anotace:

Kmen mikroorganismu Comamonas testosteroni CCM 4824 produkující vnitrobuněčnou penicilinacylasu, stabilní v rozsahu pH od 3,0 do 11,0 a teplotě do 60 °C, využitelný zejména pro přípravu 6-aminopenicilanové a 7-aminodeacetoxycefalosporanové kyseliny z penicilinu a některých derivátů cefalosporinu, pro enzymovou reverzní syntézu semisyntetických antibiotik, hydrolýzu a syntézu amidů, hydrolýzu esterů a odblokování N-koncové aminokyseliny při syntéze peptidů, nebo při dělení racemických směsí aminokyselin.

CZ 291154 B6

Kmen mikroorganismu *Comamonas testosteroni* CCM 4824Oblast techniky

5

Vynález se týká kmene mikroorganismu *Comamonas testosteroni* CCM 4824 produkujícího vnitrobuněčnou penicilinacylasu, použitelného pro biotransformace β -laktamových antibiotik, zejména pro hydrolyzu penicilinů a některých cefalosporinových derivátů a přípravu 6-aminopenicilanové kyseliny (6-APK) event. 7-aminodesacetoxycefalosporanové kyseliny (7-ADCK), a nebo pro reverzní reakci tj. přípravu semisyntetických penicilinů a cefalosporinů z těchto kyselin a příslušného acylačního agens, popřípadě hydrolyzu různých fenylacetylovaných sloučenin.

15 Dosavadní stav techniky

Je známo mnoho mikroorganismů jako zdroj enzymu penicilinacylasy (E.C. 3.5.1.11, penicilin amidohydrolasa). Podle preferenční hydrolyzy různých penicilinů byly klasifikovány jako penicilin acylasy (PGA), penicilin V acylasy (PVA) a ampicilinacylasy. Tyto průmyslově důležité enzymy jsou produkovány několika mikroorganismy včetně bakterií, aktinomycet, hub a kvasinek. Penicilin G acylasa byla popsána u řady zejména bakteriálních kmenů např. *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Kluyvera*, *Mikrococcus*, *Nocardia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Sarcina*, *Xanthomonas*. (Economic Microbiology vo 5 ed. A. H. Rose 1980, 475–522; Proc. Biochem. 24, 146–154, 1989; Proc. Biochem. 27, 1431–143, 1992; Biotechnol. Advances 18, 289–301, 2000).

Nejvíce průmyslově a komerčně je využívána PGA z *Escherichia coli* odvozená zejména z ATCC 9637 a ATCC 11105. Například kmeny *Escherichia coli* CCM 2843 a CCM 3759, které byly získány selekčními postupy se vyznačují zvýšenou aktivitou PGA nebo zvýšenou odolností proti fágové infekci (čs. patentový spis č. 244 343 a 246 957). Jsou popsány též kmeny obsahující rekombinantní plazmidy nesoucí gen z uvedených kmenů kódující PGA (čs. patentový spis č. 278 847 a 278 516). Jako producenti PGA jsou však využívány další kmeny jejichž pga heny byly sekvenovány a klonovány. Jsou to *Alcaligenes sp.* nebo *A. faecalis* (Curent Microbiology 39, 2444–2448, 1999; EP 638649; Appl. Environ. Microbiol. 63, 3412–3418, 1997), *Arthrobacter viscosus* (Appl. Environ. Microbiol. 54, 2603–2607, 1988 a 55, 1351–1356; Gene 143, 79–83, 1994), *Bacillus megatherium* (J. Bacteriol. 93, 302–306, 1967, Appl. Microbiol. Biotechnol. 25, 372–378, 1987; patent US 3 145 395; Process Biochemistry 29, 263–270, 1994), *Kluyvera citrophila* (Agric. Biol. Chem. 39, 1225–1232, 1975; Gene 49, 69–80; Biotechnol. Letters 14, 285–290, 1992), *Proteus* event. *Providentia rettgeri* (Acta Biochim. Polonica 28, 275–284, 1981; J. Bacteriol. 168, 431–433, 1986; DNA seguescens 3, 195–200, 1992. Jsou popsány kmeny *Pseudomonas melanogenum* produkující ampilicilinacylasu, enzym a úzkou substrátovou specifitou (Agric. Biol. Chem. 47, 2503–2509, 1983; Biochim. Biophys. Acta 1040, 12–18, 1990). Syntéza penicilinacylas je u uvedených kmenů je většinou indukována fenyl-octovou kyselinou, která je ve vyšší koncentraci toxická. Její koncentrace zaručující maximální indukci bez výrazné inhibice růstu se obvykle pohybuje v rozmezí 0,1 % (*Escherichia coli*) až 0,25 % (*Arthrobacter viscosus*). Většina těchto enzymů je lokalizována v periplazmatickém prostoru, takže enzymová aktivita je detekovatelná přímo s intaktními buňkami, (např. *Escherichia coli*), nebo jsou tyto enzymy extracelulární a jsou uvolňovány do média (např. *Bacillus megatherium*).

50

Uvedení producenti těchto enzymů jsou většinou používány pro hydrolyzu penicilinů nebo fenylacetylovaných derivátů cefalosporinů a přípravu 6-APK nebo 7-ADCK. Značné úsilí bylo věnováno však též zpětné reverzní reakci tj. acylaci těchto kyselin a syntézu semisyntetických penicilinů a cefalosporinů. Je vyvíjena řada postupů pro tyto enzymové syntézy za použití výše

uvedených mikroorganismů WO 98/04732, patent US 5 753 458; WO 92/01061, WO 93/12250, WO 96/02663 a WO 97/04086; Enzym. Microb. Technol. 25, 336–343, 1999).

S cílem stabilizace enzymů pro mnohonásobně opakované použití se nejčastěji používají imobilizované formy enzymů. Vzhledem k tomu, že při hydrolýze amidické vazby dochází k uvolňování kyselin, klesá zejména uvnitř částic imobilizovaných biokatalyzátorů pH. Z tohoto důvodu jsou výhodnější enzymy, které jsou stabilnější v kyselém prostředí. Tato zvýšená pH stabilita je rovněž výhodná při využití těchto acylas pro reverzní acylační reakce při enzymové přípravě semisyntetických β -laktamových antibiotik, které probíhají většinou v kyselé oblasti pH (5 až 6). Výhodná je rovněž vyšší teplotní stabilita enzymu a možnosti jeho využití při vyšších reakčních teplotách a tím zkrácení reakční doby.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je nový kmen mikroorganismu *Comamonas testosteroni* CCM 4824 produkující vnitrobuněčnou penicilinacylasu, stabilní ve velkém rozsahu pH od 3,0 do 11,0 a teplotě do 60 °C, využitelný zejména pro přípravu 6-aminopenicilanové a aminodeacetoxycefalosporanové kyseliny (6-APK a 7-ADCK) z penicilinu a některých derivátů a syntézu amidů, hydrolýzu esterů a odblokování N-koncové aminokyseliny při syntéze peptidů, nebo při dělení racemických směsí aminokyselin.

Kmen byl vybrán na základě rozsáhlého screeningu sbírkových a z přírody izolovaných kmenů nejrozličnějších rodů ze schopnosti hydrolyzovat ampicilin na 6-aminopenicilanovou kyselinu a fenylglycin. Byl získán izolací z ornice, výběrem kmene citlivého k 6-aminopenicilanové kyselině a deacylující ampicilin, mutagenezí a výběrem monokloniového izolátu bez aktivity β -laktamasy a schopného deacylace za vyšší teploty.

Nový kmen vykazuje též výhodné vlastnosti spočívající se zvýšené schopnosti růstu na živných médiích obsahujících fenylactovou kyselinu jako induktor aktivity penicilanacylasy či ampicilinacylasy. Fenylactová kyselina (FOK) je dobře utilizovatelná, nejvyšší výhodou koncentrací zajišťující dobrou indukci enzymu i buněčný růst je až 0,4 %. Některé další příbuzné kyseliny mohou mít v menší míře indukční vlastnosti. Kromě penicilinu G deacyluje kmen vyšší rychlostí ampicilin, moxycilin. Kromě β -laktamových antibiotik hydrolyzuje i amidy (fenylacetamid, fenoxycetamid) a různé fenylacetylované deriváty aromatických sloučenin jako je 2-nitro-5-fenyl-acetaminobenzoová kyselina (NIPAB). Vzhledem k pozorovaným rozdílům v relativních rychlostech hydrolýzy ampicilinu a penicilinu u různých surových preparátů enzymu nebo fází kultur kmene není vyloučena přítomnost eventuelně dvou acylas s odlišnou substrátovou specifikou.

Předmětný bakteriální kmen systematicky nepatří mezi výše uvedené známé producenty těchto enzymů. Tato nová penicilinacylasa, na rozdíl od ostatních penicilinacylas, je zřejmě z velké části lokalizována intracelulárně, neboť po dezintegraci značně stoupá tato enzymová aktivita. Výhodnou vlastností je neschopnost kmene syntetizovat enzym β -laktamasu, který katalyzuje nežádoucí degradaci β -laktamového kruhu.

Nový kmen, který je předmětem tohoto vynálezu byl podle morfologických, růstových a biochemických vlastností v soulase s taxonomickými kritérii zařazen jako *Comamonas testosteroni* a je uložen v České sbírce mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms) Masarykovy University v Brně, Tvrdého 14, po označení CCM 4824. Vlastnosti kmene jsou uvedeny v následujícím přehledu v tabulce 1.

Tabulka 1 – Charakteristika kmene *Comamonas testosteroni* CCM 4824.

A. Morfologie (mikroskopie)	
Velikost, tvar buněk:	kokotýčky, tyčky, jednotlivě, v nepravidelných shlucích
Pohyblivost:	bičíky > 1
Gram–barvení:	negativní
B. Morfologie kolonií na masopecto- novém: agaru	kulaté, hladké, lesklé, mírně vypouklé, okraj souvislý, 1–4 mm v průměru
C. Růstové podmínky:	
Teplota:	roste dobře při 37–42 °C
pH:	6,5–8,5
Vztah ke kyslíku:	striktně aerobní
Růst v přítomnosti 6,5 % NaCl	negativní
D. Fyziologické charakteristiky:	
Ox–ferm test:	alkalizace (glukóza)
Indol:	negativní
Acetylmetylkarbinol:	negativní
Metyl–red test:	negativní
Hydrolyza škrobu:	negativní
Hydrolyza tyrosinu:	pozitivní
Hydrolyza o–nitrofenyl–β–D–galaktosidu:	negativní
Hydrolyza Tween 80:	negativní
Hydrolyza eskulinu:	negativní
Hydrolyza lecithinu a DNA:	negativní
Želatina:	neztékucuje
Redukce nitrátů:	pozitivní
Redukce nitritů:	negativní
Produkce sirovodíku:	negativní
Produkce fluoresceinu:	negativní
Katalasa:	pozitivní
Ureasa:	negativní
Lysin dekarboxylasa	negativní
Ornitin dekarboxylasa	negativní
Arginin dihydrolasa:	negativní
Oxidasa:	pozitivní
Hemolýza:	negativní
Utilizace C–zdrojů: pozitivní	citrát, malonát, benzoát, fenylacetát, acetamid
Fermentace cukrů:	glukóza, mannitol, fruktóza, xylóza, maltóza bez kyselin a plynů
β–laktamasa:	negativní
E. Zdroj:	izolováno z ornice
F. Vlastnosti kmene ve vztahu k penicilinacylase	
Lokalizace enzymu:	intracelulární
Optimum pH hydrolytické aktivity:	7,0–8,0
Indukce syntézy enzymu:	kyselina fenylactová (+++), β–fenylpropionová (+), 4– aminofenylactová (+), fenoxylactová (+)
Substrátová specifita enzymu: (relativní rychlost hydrolyzy v %, bezbuněčný extrakt))	ampicilin (100), penicilin G (63), amoxycilin (136), deacetoxycefalosporin G (69), cefalexin (100), penicilin V (16), cefalosporin V (5), cefalosporin C (0), fenylacetamid (3150), fenoxycetamid (3750), β– fenylpropionamid (470), NIPAB (100)

- Kvantitativní stanovení acylasy bylo prováděno až po dezintegraci buněk sonikátorem nebo mechanickým stěrbinovým dezintegrátorem. Množství acylasy bylo určováno měření počáteční rychlosti hydrolýzy ampicilinu, penicilinu G nebo dalších substrátů v prostředí 0,1 M fosfátovém pufru pH 7,5 a teplotě 37 °C v oblasti kinetiky nultého řádu. Produkty reakce u β -laktamových antibiotik byly stanoveny spektrofotometricky za použití p-dimetylbenzaldehydu (Balasingham a sp., Biochem. Biophys. Acta 276, 250–256, 1972). Hydrolýza chromogenního substrátu NIPAB byla sledována spektrofotometrickým měřením (při 380 nm) žlutého produktu hydrolýzy tj. 2-nitro-5-aminobenzoové kyseliny. Detekce β -laktamasy byla prováděna modifikací jodometrické metody dle Sykese (Lab. Methods Antimicrob. Chemother. 64–69, eds. Reeves D. S. a kol., 1978) na plotnách po 15 minutovém působení 1% roztoku K soli penicilinu G a poté detekcí jodovým reagens. Hydrolýza amidů byla sledována stanovením uvolněných amonných iontů Bertholetovou metodou v modifikaci dle Weatherburna (Analyt. Chem. 39, 971–974, 1967).
- Jedna jednotka (U) enzymové účinnosti odpovídá tvorbě jednoho mikromolu (1 μ mol) 6-APK ev 7-ADCK za minutu za výše uvedených podmínek reakce. Specifická aktivita je definována jako $U \cdot g^{-1}$ suché hmoty buněk $U \cdot g^{-1}$ bílkovin.
- Z vlastností deacylační aktivity, zejména specifity při kyselém pH a vyšších teplotách, vyplývá reálný předpoklad využití kmene CCM 4824, který je předmětem vynálezu, nejen pro hydrolýzu, ale i reverzní reakci tj. acylaci a přípravu semisyntetických antibiotik.
- V následujících příkladech je detailně popsán způsob získání nového kmene, produkce a vlastnosti nové deacylační enzymové aktivity, aniž by se jimi omezoval.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Kmen *Comamonas testosteroni* CCM 4824 byl získán z ornice tímto způsobem:

- 10 g ornice bylo suspendováno ve fyziologickém roztoku, filtrát byl příslušně ředěn a vyset na masopeptonový agar následujícího složení (v hmotn.): Nutrient Broth (Difco) 0,8 %, kvasničný extrakt (Oxoid) 1 %, Bacto casiton (Difco) 0,5 %, NaCl 0,8 %, agar (Oxoid) 1,5 %; pH 7,2, sterilizace při 120 °C 20 min. Po nárůstu při laboratorní teplotě byly narostlé morfologicky odlišné kolonie přeneseny na čerstvý masopeptonový agar a na stejnou půdu obsahující penicilin G (K sůl) nebo 6-APA v koncentraci 100 $\mu g \cdot ml^{-1}$ půdy. Vyrostlé kolonie byly dále opět přeneseny na masopeptonový agar a po nárůstu za laboratorní teploty byly kmeny testovány na deacylační aktivitu následujícím způsobem. Důlky mikrotitračních destiček byly naplněny 50 μl 0,5% roztokem ampicilinu v 0,1 M fosfátovém pufru (pH 7,5) a biomasa izolátů byla přenesena sterilními párátky a suspendována do roztoku ampicilinu v důlkách ve dvou paralelních destičkách. Jedna paralela destiček byla inkubována přes noc při teplotě 30 °C, druhá 4 hodiny při teplotě 37 °C. Po této době bylo do důlků přidáno 200 μl detekční směsi obsahující p-dimethylaminobenzaldehyd. Po 15 minutách bylo pozorováno žluté vybarvení. Stejným způsobem byly testovány různé sbírkové bakteriální kmeny. Vybrané suspektní izoláty byly testovány submerzní jednorázovou kultivací následujícím způsobem. 500 ml varné baňky byly naplněny 100 ml tekuté živné půdy obsahující 3% kvasničný extrakt (Oxoid, pH 7,2), po sterilizaci očkované suspektními kmeny a poté inkubovány na rotačním třepacím stroji o frekvenci 240 otáček za minutu při teplotě 28 až 30 °C po dobu 24 hodin. 2 ml těchto kultur první vegetativní generace bylo použito pro očkování dvou paralelních baněk se 100 ml půdy stejného složení. Druhá vegetativní generace byla kultivována ze stejných podmínek 24 nebo 48 hodin. Poté byly kultury separovány odstředěním (14 000 G, 10 minut), supernatant slit, buněčný

sediment promyt stejným objemem 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,5 a buňky suspendovány do 4krát menšího objemu stejného pufru. Připravené suspenze byly testovány na specifickou aktivitu acylasy se substrátem ampicilinem za reakčních podmínek uvedených v popisu předmětného vynálezu. Ze série zkoumaných kmenů byl vybrán přírodní izolát, citlivý k 6-APK, který

5 vykazoval za 24 hodin kultivace aktivitu celých buněk na ampicilin 2,5 U/mg suché hmoty buněk.

Byla připravena první a druhá vegetativní generace tohoto vybraného izolátu způsobem, jak je uvedeno výše s tím rozdílem, že kultura druhé generace byla ve druhé třetině exponenciální fáze

10 růstu asepticky odstředěna a supernatant slit. Získané separované buňky byly promyty a suspendovány do stejného objemu výše uvedeného pufru. Připravená suspenze buněk byla poté přidána k roztoku N-metyl-N'-nitro-N-nitrooguanidinu ve stejném pufru tak, aby výsledná směs obsahovala cca 10^7 až 10^8 buněk $\cdot \text{ml}^{-1}$ a 150μ uvedeného mutagenu $\cdot \text{ml}^{-1}$. Směs byla

15 míchána 60 minut při laboratorní teplotě a poté byla vyseta na Petriho misky obsahující pevnou živnou půdu – masopeptonový agar. Po třídenní inkubaci při 28°C byly vyrostlé kolonie přeneseny sametovými razidly na pevnou půdu následujícího složení (v % hmotn.): Bacto casiton (Difco) 1 %, kvasničný extrakt (Difco) 0,5 %, rozpustný škrob (Lachema) 1 %, agar (Difco) 1,5 %. pH 7,2. Detekce β -laktamasy monokoloniových izolátů byla prováděna metodou

20 uvedenou v popisu předmětného vynálezu. Kolonie netvořící světlou zónu na modrém pozadí (β -laktamasa negativní) byly izolovány z původní matrice na masopeptonový agar a po nárůstu (2 až 3 dny při 28°C) byly testovány na deacylační aktivitu k ampicilinu v mikrotitračních destičkách jak je popsáno výše v tomto příkladu s tím rozdílem, že jedna paralela destiček byla inkubována 1 hodinu při 37°C a druhá 1 hodinu při 50°C . Z testovaných monocykloniových izolátů byl

25 vybrán kmen s intenzivní reakcí při 50°C . Tento získaný kmen Comamonas testosteroni CCM 4824 byl hodnocen submerzní jednorázovou kultivací, způsobem a s použitím půdy jak je uvedeno výše. Po 24 hodinové kultivaci vykazoval aktivitu $3 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ suché hmoty buněk.

Příklad 2

30

500 ml varné baňky byly naplněny 50 ml živné půdy následujícího složení (v % hmotn.):

kvasničný extrakt (Oxoid) 1 %, dihydrofosforečnan draselný 0,1 %, chlorid sodný 0,2 %, chlorid hořečnatý 0,02 % (sterilizace zvlášť), fenyloctová kyselina 0,2 % (před přidáním neutralizována

35 na sodnou sůl); pH půdy 7,2, sterilizace při 120°C . Po zaočkováním kmenem Comamonas testosteroni CCM 4824 získaným v příkladu 1 a narostlém na pevné půdě s masopeptonovým agarem (2–3 dny při 28°C), byly baňky inkubovány 24 hodin na rotačním třepacím stroji o frekvenci 240 otáček za minutu při 28°C . Poté byl 1 ml narostlé kultury první generace použit

40 pro očkování 50 ml stejné půdy a baňky byly inkubovány stejným způsobem. Specifická aktivita buněk byla zjišťována stejným způsobem jako v příkladu 1. Za použití substrátu ampicilinu a nativních buněk byla zjištěna aktivita $84 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$ živné půdy při nárůstu 3,3 g suché hmoty buněk $\cdot \text{l}^{-1}$ tj. specifická aktivita $25 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ suché hmoty buněk. Se substrátem penicilinem G bylo dosaženo aktivity $26 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ s.hm.b. Ve stejné půdě bez fenyloctové kyseliny byl zjištěn nárůst

45 buněk $1,8 \text{ g s.hm.} \cdot \text{l}^{-1}$ živné půdy a specifická aktivita $4 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ s.hm.b. (substrát ampicilin).

Příklad 3

Suspenze buněk kmene CCM 4824 získaná stejným způsobem kultivace, promývání a koncentrování jako v příkladu 1 a 2 byla dvakrát ředěna stejným pufrům a poté použita pro dezintegraci

50 buněk ultrazvukem za použití ultrasonikátoru Microson XL 2000. Vzorky byly ponořeny do ledové lázně a sonikovány (100 W, frekvence 5 kHz) čtyřikrát po 1 minutě s přestávkami půl minuty. Dezintegrovaná směs byla použita pro stanovení aktivity acylasy. Celková aktivita se substrátem ampicilinem byla $235 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$ živné půdy a specifická aktivita dosahovala $70 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$

55 suché hmoty buněk. Se substrátem penicilinem, G byla specifická aktivita $45 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ s.hm.

Příklad 4

- 5 Byla provedena kultivace kmene CCM 8424 jako v příkladu 2 s tím rozdílem, že koncentrace fenyloctové kyseliny v živné půdě byla zvýšena na 0,4 %. Narostlá kultura byla zpracována stejným způsobem jako v příkladu 3. Výtěžek suché hmoty buněk byl 4,3 g.l⁻¹ půdy, aktivita acylasy 302 U.l⁻¹ půdy a 70 U.g⁻¹ s.hm. (substrát ampicilin). Se substrátem penicilinem G byla specifická aktivita 40 U.g⁻¹ s.hm.

10

Příklad 5

- 15 Ve fermentačním tanku o objemu 75 litrů (průměr 350 mm, výška 810 mm) vybaveném duplikátorem, 4 zarážkami, aeračním věncem, třemi radiálními míchadly se šesti lopatkami o průměru 120 mm na jednom hřídeli (vzdálenost míchadel od sebe 250 mm, spodního ode dna 85 mm) bylo připraveno 50 litrů živné půdy následujícího složení (v % hmotn.): kvasničný extrakt (OHL) 1 %, dihydrofosforečnan draselný 0,1 %, chlorid sodný 0,2 %, chlorid hořečnatý 0,02 % (sterilizace zvlášť), fenyloctan amonný 0,474 %, protipěnidlo SAG 471 0,005 %, vodovodní
20 voda, pH 7,2 sterilizace při 120 °C 40 minut. Varné baňky (20 kusů) o objemu 500 ml byly naplněny 50 ml půdy stejného složení (bez SAG) a po sterilizaci byly očkovány kmenem CCM 4824 a poté provedena kultivace první generace jako v příkladu 2. Po 24 hodinách byly kultury v baňkách za aseptických podmínek slity a použity pro očkování fermentoru. Kultivace probíhala za míchání 400 otáček za minutu a vzdušnění 13,5 litrů při teplotě 28 °C po dobu
25 17 hodin. Výtěžek suché hmoty buněk byl 5,2 g.l⁻¹ živné půdy, aktivita acylasy 213 U.l⁻¹ živné půdy a specifická aktivita 41 U.g⁻¹ s.hm. (substrát ampicilin). Se substrátem penicilinem G byla specifická aktivita 31 U.g⁻¹ s.hm. Po ukončení kultivace byly buňky separovány na odstředivce Sharples a získaná buněčná pasta byla suspendována v 0,025 M fosfátovém pufru o pH 7,5 v koncentraci 140 g vlhké hmoty buněk litr⁻¹ suspenze. Poté byla provedena dezintegrace buněk
30 trojnásobným průchodem mechanickým štěrbínovým dezintegrátorem Manton Gualin za chlazení mezi cykly na teplotu cca 15 °C. Aktivita získané dezintegrované směsi byla 1995 U.l⁻¹ a 120 U.g⁻¹ suché hmoty se substrátem ampicilinem a 1330 U.l⁻¹ a 80 U.g⁻¹ suché hmoty se substrátem penicilinem G.

35

Příklad 6

- Dezintegrováný homogenát získaný způsobem, jak je popsáno v příkladu 5, byl centrifugován (14 000 G, 10 minut). Získaný supernatant vykazoval aktivitu se substrátem ampicilinem
40 1966 U.l⁻¹ a 150 U.g⁻¹ bílkovin, s penicilinem G 1310 U.l⁻¹ a 100 U.g⁻¹ bílkovin. K 300 ml tohoto bezbuněčného extraktu bylo za chlazení (cca 15 °C), míchání a udržování pH na hodnotě 7,2 postupně přidáváno 13,93 g síranu amonného. Po 15 minutách míchání byl roztok ponechán přes noc při 5 °C a vzniklá sraženina separována centrifugací (14 000 g, 30 minut). Sediment byl poté rozpuštěn v 0,01 M fosfátovém pufru o pH 7,2 a dialyzován přes noc proti stejnému pufru.
45 Vzniklý roztok (68 ml) měl aktivitu acylasy s ampicilinem 4289 U.l⁻¹, s penicilinem G 2859 U.l⁻¹ a specifická aktivita byla 302 resp. 202 U.g⁻¹ bílkovin.

Příklad 7

50

- Bezbuňčný extrakt získaný v příkladu 6 byl rozdělen na díly, ve kterých bylo za míchání upraveno pH pomocí 2M kyseliny octové nebo 4% hydroxidem sodným na hodnoty 4, 7, 10 a vzorky byly ponechány 1 hodinu 5, 40, 50 a 55 °C. Po této době bylo pH opět upraveno na výchozí hodnotu (7,0–7,2) a stanovena aktivita acylasy se substrátem ampicilinem a penicilinem

G. Výsledky shrnuté v následující tabulce 2 ukazují na značnou stabilitu této enzymové aktivity k extrémním pH a teplotě.

5 Tabulka 2 – Vliv pH a teploty na stabilitu penicilinacylasy v bezbuněčném extraktu

teplota (1 h, °C)	pH	substrát	aktivita (U.l ⁻¹ extraktu)
5	4,0	ampicilin	1990
		penicilin G	1400
5	7,0	ampicilin	2000
		penicilin G	1335
5	10,0	ampicilin	1926
		penicilin G	1350
40	4,0	ampicilin	2200
		penicilin G	1375
40	7,0	ampicilin	2098
		penicilin G	1458
55	7,0	ampicilin	2050
		penicilin G	1206
60	7,0	ampicilin	1722
		penicilin G	1188

Průmyslová využitelnost

10

Kmen *Comamonas testosteroni* CCM 4824 podle vynálezu lze využít ve farmaceutickém průmyslu.

15

PATENTOVÉ NÁROKY

20

1. Kmen mikroorganismu *Comamonas testosteroni* CCM 4824 produkující vnitrobuněčnou penicilinacylasu, stabilní v rozsahu pH od 3,0 do 11,0 a teplotě do 60 °C, využitelný zejména pro přípravu 6-aminopenicilanové a 7-aminodeacetoxycefalosporanové kyseliny z penicilinu a některých derivátů cefalosporinu, pro enzymovou reverzní syntézu semisyntetických antibiotik, hydrolýzu a syntézu amidů, hydrolýzu esterů a odblokování N-koncové aminokyseliny při

25

syntéze peptidů, nebo při dělení racemických směsí aminokyselin.

30

Konec dokumentu
