



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 08.09.76 (P. 192274)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 28.03.78

Opis patentowy opublikowano: 30.06.1979

Int. Cl.² G07G 7/028
C12D 13/10



Twórcy wynalazku: Apolinary Szewczuk, Marian Mordarski, Maria Wellman-Bednawska, Edmund Ziomek, Edward Żukowski, Jerzy Luba, Barbara Borowska, Ewa Bujnowska, Kazimiera Skrzypkowska

Uprawniony z patentu: Tarchomińskie Zakłady Farmaceutyczne „Polfa”,
Warszawa (Polska)

Sposób wytwarzania immobilizowanej amidazy penicylinowej

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania immobilizowanej amidazy penicylinowej. Enzym ten jest stosowany do hydrolizy penicylin w produkcji kwasu 6-aminopenicylanowego.

Z polskiego opisu patentowego nr 79 702 znany jest sposób otrzymywania amidazy penicylinowej, związanej kowalencyjnie na kopolimerze akryloamidowym, polegający na tym, że kopolimer akryloamidu, N,N'-metyleno-bis-akryloamidu i kwasu maleinowego ogrzewa się pod zmniejszonym ciśnieniem, a otrzymany produkt poddaje się reakcji z wodnym buforowanym roztworem enzymu. Sposób ten wymaga przeprowadzenia trzech operacji, a mianowicie wytworzenia kopolimeru, jego ogrzewania i reakcji z enzymem.

Okazało się, że amidazę penicylinową, immobilizowaną na kopolimerze akryloamidu, można otrzymać w sposób prostszy i dogodniejszy, obejmujący jedynie dwa etapy.

Sposób według wynalazku polega na tym, że amidazę penicylinową poddaje się reakcji z bezwodnikiem nienasyconego kwasu dwukarboksylowego, a otrzymany zmodyfikowany enzym przeprowadza się w kopolimer akryloamidu, ewentualnie w obecności substancji o charakterze wypełniacza.

Reakcji z bezwodnikiem nienasyconego kwasu dwukarboksylowego można poddawać amidazę penicylinową zarówno w postaci czystej, jak i w postaci wstępnie oczyszczonego enzymu o stosun-

2

kowo niskiej aktywności. Reakcję prowadzi się w zbuforowanym środowisku wodno-organicznym przy wartości pH od około 5 do około 8 i w niskiej temperaturze (około 0—5°C) dla zapobieżenia szybkiej hydrolizie bezwodnika. Bezwodnik nienasyconego kwasu dwukarboksylowego stosuje się korzystnie w ilości do około 90 mikromoli/mg białka, gdyż przy wyższej ilości otrzymuje się preparaty o niższej aktywności enzymatycznej. Jako bezwodnik nienasyconego kwasu dwukarboksylowego korzystnie stosuje się bezwodnik kwasu maleinowego. Wydajność reakcji wynosi około 90%.

Otrzymana zmodyfikowana amidaza penicylinowa jest nierozpuszczalna w środowisku kwaśnym (wartość pH około 3,0), co można wykorzystać do jej wyodrębnienia. Charakteryzuje się ona zmniejszoną ilością wolnych grup aminowych (oznaczonych przez reakcję z TNBS), zwiększoną ruchliwością elektroforetyczną (zbadaną za pomocą elektroforezy dyskowej) i wyższą stabilnością termiczną w porównaniu z enzymem niemodyfikowanym. Właściwości te przedstawione są w tablicach 1 i 2.

Otrzymaną zmodyfikowaną amidazę penicylinową przeprowadza się następnie w jeden z kopolimerów, stosowanych zazwyczaj do otrzymywania immobilizowanych enzymów. Ze względu na warunki prowadzenia procesu kopolimeryzacji szczególnie przydatne są kopolimery, otrzymywane z monomerów rozpuszczalnych w wodzie, zwłaszcza kopolimery akryloamidu. Korzystnie stosuje się ko-

polimery otrzymane z akryloamidu i N,N'-dualilodwuamidów kwasów dwukarboksylowych zwłaszcza N,N'-dualilodwuamidów kwasu malonowego lub kwasu winowego. Kopolimery te odznaczają się dużą elastycznością i można je liofilizować i przechowywać w stanie suchym przez dłuższy okres czasu bez zmniejszenia aktywności immobilizowanej amidazy penicylinowej. Zamiast tych dualilodwuamidów można stosować także metyleno-bis-akryloamid, znany czynnik usieciwiający poliakryloamid, lecz w tym przypadku uzyskane kopolimery nie posiadają wymaganej elastyczności, są kruche i łatwo się ścierają.

Proces kopolimeryzacji prowadzi się w obecności układu: katalizator-inicjator. Są to substancje zazwyczaj stosowane w tego typu reakcjach, na przykład nadsiarczany, rybopławina, N,N,N',N'-tetrametyloetylenodwuamina lub β -dwumetyloamino-propionitryl.

Proces kopolimeryzacji można prowadzić w obecności substancji o charakterze wypełniacza. Korzystnie stosuje się niskocząsteczkowe substancje rozpuszczalne w wodzie, takie jak na przykład sacharoza, które zwiększają porowatość otrzymanego kopolimeru i podnoszą jego aktywność enzymatyczną.

Reakcję kopolimeryzacji prowadzi się w zbuforowanym roztworze wodnym w atmosferze gazu obojętnego. Otrzymany kopolimer granuluje się w zwykły sposób i dokładnie przemycza roztworem buforu o odczynie zbliżonym do obojętnego, otrzymując preparat immobilizowanej amidazy penicylinowej o wysokiej aktywności enzymatycznej (kilka j/ml). Reakcję kopolimeryzacji można też prowadzić w rozpuszczalniku organicznym w obecności rozpuszczonego w nim środka powierzchniowo czynnego przy energicznym mieszaniu. Jako rozpuszczalnik organiczny korzystnie stosuje się roztwór czterochlorku węgla lub chloroformu w toluenie, a jako środek powierzchniowo czynny — oleinian sorbitolu, znany w handlu pod nazwą Span 80. W tym przypadku uzyskuje się kopolimer w postaci sferycznych granulek. Średnica tych granulek maleje wraz ze wzrostem ilości środka powierzchniowo czynnego, dodanego do rozpuszczalnika organicznego. Przy użyciu środka Span 80 w ilości około 1% można uzyskać granulki o średnicy do 0,4 mm. Wydajność procesu wynosi zazwyczaj około 50% w przeliczeniu na enzym użyty do immobilizacji.

Immobilizowana amidaza penicylinowa, otrzymywana sposobem według wynalazku, zachowuje pełną aktywność enzymatyczną przy wielotygodniowym przechowywaniu w chłodni w temperaturze 4°C a w temperaturze 37°C w ciągu miesiąca traci 30—40% aktywności, co przedstawia tablica 2. Immobilizowana amidaza jest stosowana do enzymatycznego rozszczepiania penicylin, zwłaszcza benzylpenicyliny, przy czym otrzymuje się kwas 6-aminopenicylanowy z wydajnością powyżej 90% wydajności teoretycznej. Hydrolizę penicylin przy użyciu immobilizowanej amidazy penicylinowej, otrzymanej sposobem według wynalazku, prowadzi się w zbuforowanym środowisku wodnym o wartości pH 7—8, przy czym korzystnie stosuje się bufor

fosforanowy. Podczas przebiegu reakcji wartość pH utrzymuje się na stałym poziomie przez dodawanie roztworów substancji zasadowych.

Hydrolizę prowadzi się w temperaturze około 25—45°C, korzystnie 35—38°C. Czas trwania reakcji jest zależny od temperatury, stężenia i rodzaju użytej penicyliny oraz od stosunku aktywności immobilizowanego enzymu do ilości penicyliny. Hydrolizę można prowadzić przy stosunkowo wysokich stężeniach penicyliny (do około 10%), przy czym korzystnie stosuje się penicylinę w postaci soli. Sposób według wynalazku jest objaśniony poniższymi przykładami, które jednakże nie ograniczają jego zakresu.

Przykład I. a) Otrzymywanie zmodyfikowanej amidazy penicylinowej.

Do 12,4 ml oziębionego roztworu częściowo oczyszczonej amidazy penicylinowej, pochodzącej z komórek *Escherichia coli*, w buforze fosforanowym o wartości pH 5,8 o stężeniu białka 25 mg/ml i aktywności swoistej 1,5 j/mg wkrapla się powoli, mieszając, 1,2 ml 4,5 M roztworu bezwodnika maleinowego w suchym acetonie.

Podczas reakcji wartość pH utrzymuje się na poziomie wyjściowym przez dodawanie 0,8 M roztworu węgla sodu. Następnie chłodzony roztwór miesza się przez 15 minut i pozostawia na 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po odsączeniu powstałego osadu przesącz dializuje się w ciągu 16 godzin do 1 litra 0,01 M buforu fosforanowego o wartości pH 5,8, otrzymując około 18 ml roztworu zmodyfikowanej amidazy penicylinowej o aktywności swoistej 1,3 j/mg.

b) Otrzymywanie immobilizowanej amidazy penicylinowej przez kopolimeryzację w bloku.

W 5 ml roztworu zmodyfikowanej amidazy penicylinowej, otrzymanej sposobem opisanym w przykładzie Ia, rozpuszcza się 0,75 g akryloamidu, 0,038 g N,N'-dualilodwuamidu kwasu malonowego i 1 g sproszkowanej sacharozy, a następnie dodaje się 0,05 ml 5% roztworu nadsiarczanu amonowego i 0,05 ml 5% roztworu N,N,N',N'-tetrametyloetylenodwuaminy i uzyskany roztwór szybko wysycha się azotem. Dla dalszej polimeryzacji roztwór pozostawia się w atmosferze azotu na okres 15 godzin w temperaturze 25°C.

Otrzymany żel przeciera się przez sito o przekroju oczek 0,3 mm, a granulki przemycza się kolejno 0,1 M buforem fosforanowym o wartości pH 7,5, następnie tym samym buforem z dodatkiem 0,5 M roztworu chlorku sodu, a wreszcie samym buforem. Otrzymuje się około 17 ml upakowanego, granulowanego żelu o aktywności około 3,5 j/ml. Wydajność procesu immobilizacji wynosi około 60% w przeliczeniu na użytą amidazę.

c) Otrzymywanie immobilizowanej amidazy penicylinowej przez kopolimeryzację w sferycznych granulach.

W 2 ml roztworu zmodyfikowanej amidazy penicylinowej, otrzymanej sposobem opisanym w przykładzie Ia, rozpuszcza się 0,2 g akryloamidu, 0,01 g N,N'-dualilodwuamidu kwasu L-winowego i 0,4 g sacharozy. Następnie dodaje się 0,02 ml 1,5 % roztworu nadsiarczanu amonu i taką samą ilość roztworu N,N,N',N'-tetrametyloetylenodwuaminy,

po czym roztwór wysycha się szybko azotem i wkrapla do intensywnie mieszanej fazy organicznej o temperaturze 25°C, także uprzednio wysyczonej azotem, o składzie następującym: 8 ml toluenu i 2 ml czterochlorku węgla z dodatkiem 0,6% detergentu Span 80 i 0,01% N,N,N',N'-tetrametyloetylenodwuaminy.

Polimeryzacja rozpoczyna się po kilku minutach, a kończy po upływie 15 godzin. Utworzone sferyczne granulki odsąca się na lejku Büchnera, przemywa toluenem, 0,1 M buforem fosforanowym o wartości pH 7,5 z dodatkiem Tweenu 80, a wreszcie samym buforem. Uzyskuje się około 7 ml upakowanych, okrągłych granulek o średnicy od 0,15 do 0,45 mm, wykazujących aktywność amidazy około 2 j/ml. Wydajność procesu wynosi około 50% w przeliczeniu na enzym użyty do immobilizacji.

d) Otrzymywanie immobilizowanej amidazy penicylinowej przez kopolimeryzację w bloku.

W roztworze zmodyfikowanej amidazy penicylinowej, otrzymanym sposobem opisanym w przykładzie Ia, rozpuszcza się 3,6 g sacharozy, 1,8 g akryloamidu i 0,18 g N,N'-metyleno-bis-akryloamidu, po czym dodaje się 0,75 ml 1% roztworu nadsiarczanu amonu i 0,75 ml 0,1% roztworu N,N,N',N'-tetrametyloetylenodwuaminy. Uzyskany roztwór pozostawia się w temperaturze 25°C w atmosferze azotu na okres 15 godzin. Otrzymany żel przeciera się przez sito o przekroju oczek 0,5 mm, a uzyskane granulki przemywa się trzykrotnie 0,1 M buforem fosforanowym o wartości pH 7,8. Otrzymuje się 40 ml żelu o aktywności enzymatycznej 3,5 j/ml. Aktywność amidazy penicylinowej określa się metodą kalorymetryczną według Balasinghan et al., Biochem. Biophys. Acta 1972, 276, 250—256.

Przykład II. Wytwarzanie kwasu 6-aminopenicylanowego.

Do 10 ml immobilizowanej amidazy penicylinowej, otrzymanej sposobem opisanym w przykładzie I, dodaje się 2 g soli potasowej penicyliny G, rozpuszczonej w 40 ml 0,1 M buforu fosforanowego, i miesza się w temperaturze 37°C przez 6 godzin.

Wartość pH utrzymuje się na poziomie 7,5—7,8 przez wkraplanie 0,8 M roztworu węglanu sodu.

Po upływie tego czasu w mieszaninie reakcyjnej stwierdza się obecność kwasu 6-aminopenicylanowego (96% ilości teoretycznej). Zawiesinę sący się, przemywa 0,1 M buforem fosforanowym o wartości pH 7,8 i z przesączu wyodrębnia się kwas 6-aminopenicylanowy znanymi metodami. Żel immobilizowanej amidazy penicylinowej można ponownie użyć do hydrolizy penicyliny.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania amidazy penicylinowej immobilizowanej na kopolimerze akryloamidu, **znamienny tym**, że amidazę penicylinową poddaje się reakcji z bezwodnikiem nienasyconego kwasu dwukarboksylowego, a otrzymany zmodyfikowany enzym przeprowadza się w kopolimer, ewentualnie w obecności substancji o charakterze wypełniacza.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako bezwodnik nienasyconego kwasu dwukarboksylowego stosuje się bezwodnik kwasu maleinowego.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zmodyfikowany enzym przeprowadza się w kopolimer akryloamidu i N,N'-dwaallilodwuamidu kwasu dwukarboksylowego.

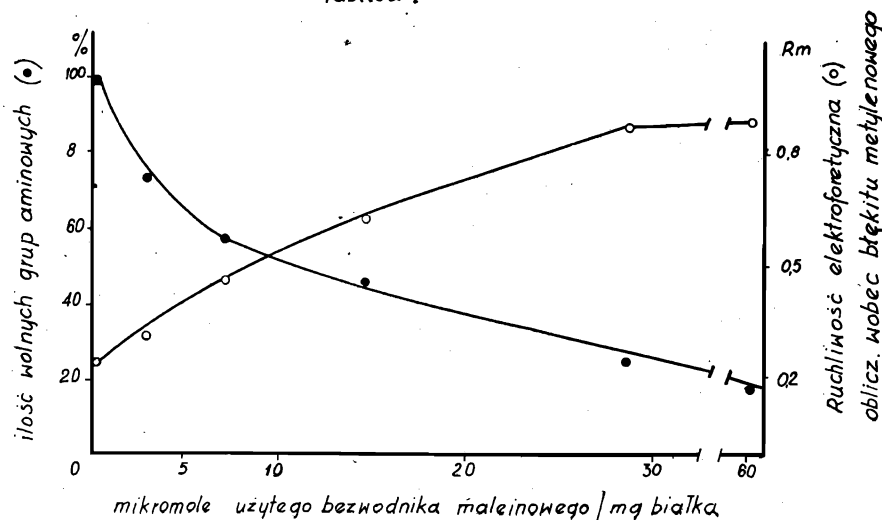
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zmodyfikowany enzym przeprowadza się w kopolimer akryloamidu i metyleno-bis-akryloamidu.

5. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że jako N,N'-dwaallilodwuamid kwasu dwukarboksylowego stosuje się N,N'-dwaallilodwuamid kwasu malonowego lub kwasu winowego.

6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zmodyfikowany enzym przeprowadza się w kopolimer w obecności układu: katalizator — inicjator polimeryzacji.

7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako substancję o charakterze wypełniającym stosuje się sacharozę.

Tablica I



Tablica 2

Wpływ ogrzewania w 0,1 M buf. fosf. pH 7,5 w 37°
na aktywność acylazy penicylinowej.

