

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

126358

Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 10.08.79 (P. 217680)

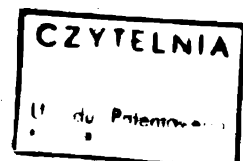
Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 27.03.81

Opis patentowy opublikowano: 15.07.1985

Inf. Cl⁹.

C12N 11/08



Twórcy wynalazku: Apolinary Szewczuk, Edmund Ziomek, Marian Mor-darski, Maciej Siewiński, Krzysztof Sobiech, Jadwi-ga Wieczorek, Jan Wojskowicz, Edward Żukowski, Jerzy Luba, Wiesław Drzewiński, Ewa Bujnowska, Barbara Winterot

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

Sposób wytwarzania preparatu enzymatycznego, służącego do otrzymywania kwasu 6-aminopenicylanowego

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarza-nia preparatu enzymatycznego, służącego do otrzy-mywania kwasu 6-aminopenicylanowego przez hydrolizę benzylopenicyliny. Kwas 6-aminopenicy-lanowy jest podstawowym półproduktem przy

5 otrzymywaniu penicylin półsyntetycznych.

Enzymatyczną hydrolizę penicylin naturalnych do kwasu 6-aminopenicylanowego prowadzono do-tychczas przy użyciu całych komórek drobnoustro-jów — producentów amidazy penicylinowej (bio-masy) lub też przy użyciu enzymu wyodrębnione-go z tych komórek, oczyszczonego i ewentualnie

10 przeprowadzonego w odpowiedni preparat enzy-matyczny przez immobilizację na nośniku, naj-częściej polimerycznym. Pierwsza z tych metod daje produkt zanieczyszczony substancjami wy-sokocząsteczkowymi, głównie białkami, które uwal-niają się z komórek drobnoustroju i powodują

15 odczyny alergiczne. Natomiast stosowanie prepa-ratów amidazy penicylinowej immobilizowanej na nośnikach, jakkolwiek umożliwia otrzymanie czy-stego produktu, jest kosztowne ze względu na skomplikowany proces wydzielania i oczyszczania enzymu.

Problem ten został rozwiązany przez opracowa-nie metody hydrolizy penicyliny przy użyciu cał-ych komórek drobnoustroju wytwarzającego amidazę penicylinową, unieruchomionych na po-limerycznym nośniku.

2

W polskim opisie patentowym nr 94 936 przed-stawiano sposób unieruchamiania komórek drobno-ustrojów produkujących enzymy, polegający na tym, że komórki kontaktuje się ze zdolnym do

5 polimeryzacji monomerem etylenowym, posiada-jącym grupę reaktywną względem zawartych w komórkach grup aminowych, hydroksylowych i sulfonowych (na przykład grupę epoksydową, chlorowcokarbonylową, chlorowcometylokarbony-lową). Następnie związany z komórką monomer

10 polimeryzuje się lub kopolimeryzuje w obecności monomeru sieciującego, korzystnie metylenobis-a-kryloamidu i układu inicjującego, oraz poddaje działaniu wielofunkcyjnego reagenta sieciującego,

15 korzystnie aldehydu glutarowego, celem zmniej-szenia strat enzymu z komórek.

Z publikacji T. Sato, T. Tosa, I. Chibata, Europ. J. Applied Microbiol. 1976, 2, 153, znane jest otrzymywanie komórkowego preparatu enzy-matycznego przez polimeryzację akryloamidu w za-wiesinie komórek Escherichia coli w obecności

20 metylenobis-akryloamidu jako środka sieciującego.

Pomimo to istnieje nadal potrzeba podniesienia opłacalności procesu enzymatycznej hydrolizy

25 penicyliny. Można to osiągnąć przez przedłużenie okresu stosowania preparatu enzymatycznego i zmniejszenia strat jego aktywności oraz przez wprowadzenie bardziej ekonomicznych, ciągłych metod prowadzenia samej hydrolizy (zwłaszcza

30 metody fluidalnej). W tym celu konieczne jest

wytwarzanie preparatu enzymatycznego o odpowiednich właściwościach fizykochemicznych.

Z polskiego opisu patentowego nr 102 256 znany jest preparat enzymatyczny, otrzymywany z wyodrębnionej z komórek drobnoustroju i oczyszczonej amidazy penicylinowej, immobilizowanej na żelu poliakryloamidowym usieciowanym za pomocą dwuallilodwuamidów kwasów dwukarboksylowych, przy czym enzym jest trwale związany z żelem dzięki użyciu bezwodnika nienasyconego kwasu dwukarboksylowego. Wyodrębniony i oczyszczony enzym poddaje się reakcji z bezwodnikiem nienasyconego kwasu dwukarboksylowego i tak otrzymany zmodyfikowany enzym poddaje się polimeryzacji w układzie akryloamid/dwuallilodwuamid mechaniczna i chemiczna tego preparatu jest dobra, lecz jeszcze nie wystarczająca do prowadzenia ciągłej hydrolizy penicyliny w układzie fluidalnym, najbardziej dogodnym w skali przemysłowej. Preparat ten jest przy tym dość kosztowny ze względu na konieczność wyodrębniania i oczyszczania enzymu.

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano sposób wytwarzania nowego, komórkowego preparatu enzymatycznego, służącego do otrzymywania kwasu 6-aminopenicylanowego przez hydrolizę benzylopenicyliny w środowisku wodnym przy wartości pH 6,0—9,0. Preparat ten posiada bardzo korzystne właściwości, pozwalające na prowadzenie hydrolizy w układzie fluidalnym, a koszt jego wytwarzania jest niewielki.

Sposób według wynalazku polega na tym, że całe komórki drobnoustroju produkującego amidazę penicylinową, zwłaszcza komórki *Escherichia coli*, immobilizuje się w żelu poliakryloamidowym usieciowanym za pomocą dwuallilodwuamidu kwasu dwukarboksylowego, korzystnie dwuallilodwuamidu kwasu winowego lub kwasu malonowego, i poddaje działaniu aldehydu glutarowego.

Preparat enzymatyczny otrzymywany sposobem według wynalazku różni się od preparatu przedstawionego w polskim opisie patentowym nr 102 256 użyciem całych, nienaruszonych komórek drobnoustroju produkującego enzym zamiast wyodrębnionego i oczyszczonego enzymu. Całe komórki drobnoustroju zawierają, oprócz żądanego enzymu, także dużą ilość innych związków chemicznych o różnorodnym charakterze, a ponadto otoczone są błoną komórkową. Jest więc oczywiste, że charakter polimerycznych preparatów enzymatycznych, otrzymywanych przy użyciu wyodrębnionego enzymu lub przy użyciu nienaruszonych komórek, jest odmienny. Różnica pomiędzy całymi komórkami drobnoustroju i cząsteczkami wyodrębnionego enzymu pociąga za sobą również różnicę metod chemicznych, stosowanych dla unieruchomienia enzymu w nośniku polimerycznym. W sposobie według polskiego opisu patentowego nr 102 256 konieczne jest uprzednie zmodyfikowanie enzymu przez poddanie go reakcji z bezwodnikiem nienasyconego kwasu dwukarboksylowego. Dopiero tak otrzymany zmodyfikowany enzym można poddać procesowi polimeryzacji. Natomiast

w sposobie według wynalazku komórki drobnoustroju, zawierające enzym, można poddawać polimeryzacji bez uprzedniego przekształcenia chemicznego i przeprowadzenia w postać zmodyfikowaną. Obróbka chemiczna za pomocą aldehydu glutarowego, stosowana w sposobie według wynalazku, może być prowadzona zarówno przed procesem polimeryzacji, jak i po nim. Ma ona na celu zmniejszenie strat białka, lecz nie jest konieczna dla przeprowadzenia polimeryzacji.

Immobilizowane komórki drobnoustroju wytwarza się przez polimeryzację akryloamidu i czynnika sieciującego jako układ katalizator — inicjator stosuje się związki, używane zazwyczaj w tego typu reakcjach; korzystnie stosuje się ropuszczalny w wodzie nadsiarczan (np. nadsiarczan sodu) i N,N,N',N' -tetrametyloetylenodwuaminę.

Użycie dwuallilodwuamidu kwasu dwukarboksylowego jako środka usieciowującego poliakryloamid jest korzystniejsze od stosowania metylenobis-akryloamidu, ponieważ uzyskany usieciowany żel poliakryloamidowy lepiej nadaje się do prowadzenia reakcji hydrolizy penicyliny w układzie fluidalnym. W doświadczeniach z różnymi żelami zaobserwowano, że żele poliakryloamidowe, usieciowane za pomocą dwuallilodwuamidu kwasu winowego (DATA) i dwuallilodwuamidu kwasu malonowego (DAMA) w warunkach fluidacji zwiększają o kilkadziesiąt procent swoją objętość pozorną przy identycznej szybkości objętościowej płynu w porównaniu z żelem otrzymanym z metylenobis-akryloamidu (BIS) (rys. 1). Jeśli chodzi o równomierność przepływu płynu przez fluidalną zawieszinę żeli, to najlepszy żel uzyskany z DAMA, dla którego jednakowej szybkości objętościowej przepływu stwierdzono najniższą szybkość liniową przepływu przez zawieszinę fluidalną (rys. 2).

Proces polimeryzacji można prowadzić w środowisku wodnym w atmosferze azotu. Uzyskany żel przeciera się przez sito, kroi lub rozdrabnia w inny sposób w celu uzyskania cząstek o odpowiednich rozmiarach. Polimeryzację można prowadzić również w dwufazowym układzie wodno-organicznym, przy czym ciężar właściwy fazy organicznej powinien być zbliżony do ciężaru właściwego fazy wodnej. Korzystnie fazę organiczną stanowi roztwór chlorowanych węglowodorów w węglowodarach aromatycznych lub alicyklicznych, a zwłaszcza roztwór chloroformu lub czterochlorku węgla w cykloheksanie lub toluenie. Uzyskany żel ma wówczas postać małych, okrągłych kuleczek i nie wymaga dalszego rozdrabniania. Dodatek środków powierzchniowo czynnych, rozpuszczalnych w ropuszczalnikach organicznych, takich jak np. oleinian sorbitolu, znany w handlu pod nazwą Span 80, umożliwia powstawanie kuleczek o odpowiedniej średnicy i zapobiega ich zlepianiu się. Korzystne jest również przemywanie komórek drobnoustroju przed polimeryzacją roztworami o wysokiej sile jonowej, co także zapobiega zlepianiu się powstających kuleczek żelu podczas gwałtownej polimeryzacji.

Istotną cechą sposobu według wynalazku jest traktowanie immobilizowanych komórek drobnou-

stroju aldehydem glutarowym, co zapobiega szybkiemu uwalnianiu się białka oraz amidazy penicylinowej z otrzymanego żelu podczas inkubacji w roztworach buforowych. W tym celu żel wytrząsa się w buforowanym roztworze aldehydu glutarowego, a następnie przepłukuje. Po takiej operacji stabilność termiczna amidazy w immobilizowanych komórkach znacznie wzrasta, a ilość białka, uwalnianego podczas inkubacji w temperaturze 37°C, jest znikoma. Zamiast obróbki żelu aldehydem glutarowym można traktować tym związkiem zawieszoną komórek przed immobilizacją, co przedstawiono na rys. 3.

Otrzymany żel wykazuje 60–70% aktywności amidazy penicylinowej w stosunku do aktywności zawiesiny komórek, użytej do immobilizacji. Przez oznaczenie absolutnej ilości enzymu metodą miareczkowania za pomocą fenylometrylosulfonylofluorku (Shvyadas et al., Bioorganiczna Chemia 1977, 3, 546–554) stwierdzono, że immobilizowane komórki zawierają 70–80% amidazy w porównaniu z ilością enzymu w komórkach użytych do immobilizacji.

Immobilizowane komórki *Escherichia coli* zachowują nie zmienioną aktywność amidazy penicylinowej przy wielotygodniowym przechowywaniu w chłodni, natomiast ogrzewane w temperaturze 37°C w buforze fosforanowym przy wartości pH 7,8 w ciągu trzech tygodni tracą około 40% aktywności, co przedstawiono na rys. 3.

Hydrolizę benzylopenicyliny przy użyciu preparatu enzymatycznego, otrzymywanego sposobem według wynalazku, prowadził się w temperaturze około 37°C i przy wartości pH wynoszącej korzystnie około 7,8, którą to wartość utrzymuje się, dodając porcjami lub w sposób ciągły alkalia. Jako substrat stosuje się łatwo rozpuszczalną w wodzie sól benzylopenicyliny, zwłaszcza sól potasową. Reakcję hydrolizy można prowadzić w układzie stacjonarnym, mieszając granulki żelu w roztworze soli penicyliny. Korzystniejsze jest jednak prowadzenie procesu w sposób ciągły, a zwłaszcza w układzie fluidalnym ze względu na opisane powyżej właściwości żelu. W przypadku tej ostatniej metody szczególnie dogodnie jest stosowanie żelu w postaci granulek, a zwłaszcza kuleczek. Zawieszoną granulek żelu utrzymuje się w stanie fluidyzacji przez odpowiedni, stosunkowo szybki przepływ buforowanego roztworu penicyliny. Kulisty kształt granulek żelu zmniejsza ich podatność na ścieranie i ułatwia ich utrzymanie w stanie jednolitej zawiesiny w reaktorze fluidalnym.

Sposób według wynalazku jest objaśniony następującymi przykładami.

Przykład I: Otrzymywanie immobilizowanych komórek *Escherichia coli*, szczep nr 271, w postaci kuleczek żelu.

Komórki *Escherichia coli* szczep nr 271, wydzielone z hodowli przez wirowanie, przemywa się dwukrotnie solą fizjologiczną, po czym zawiesza w 4 objętościach 1 M NaCl w 0,05 M buforze fosforanowym o wartości pH 5,8 i miesza w temperaturze 25°C przez 30 minut. Uzyskaną po odwirowaniu biomasa ponownie miesza się z buforowanym roztworem NaCl, a po odwirowaniu przemy-

wa 0,1 M buforem fosforanowym o wartości pH 5,8 i zawiesza w 1 objętości tego buforu.

Otrzymywanie fazy wodnej. Do 3 cm³ otrzymanej zawiesiny komórek o aktywności amidazy penicylinowej około 10 j/g wkrapla się 1 cm³ 3% roztworu nadsiarczuanu amonu i miesza w temperaturze 0°C przez 30 minut. Następnie do zawiesiny wkrapla się 2 cm³ roztworu 45% akryloamidu i 4,5% dwuallilodwuamidu kwasu małonowego w 0,1 M buforze fosforanowym o wartości pH 5,8.

Otrzymywanie fazy organicznej. Faza organiczna składa się z czterochlorku węgla i cykloheksanu w stosunku 35:65 (v/v) z dodatkiem 3% środka powierzchniowo czynnego o nazwie Span 85.

Do 25 cm³ fazy organicznej wkrapla się w atmosferze azotu 6 cm³ fazy wodnej, mieszając i chłodząc wodą z lodem. Po upływie 2–3 minut wkrapla się 1 cm³ 2,5% roztworu tetrametyloetylenodwuaminy w fazie organicznej. Następnie temperaturę łaźni wodnej podnosi się w ciągu 15–20 minut do 25°C i utrzymuje mieszaninę w tej temperaturze przez 30 minut. Utworzone kuleczki żelu odsadza się, przemywa roztworem 0,2% środka powierzchniowo czynnego o nazwie handlowej Tween 20 w 0,1 M buforze fosforanowym, a następnie samym buforem fosforanowym.

Uzyskany żel zawiesza się w 4 objętościach 2,5% roztworu aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze fosforanowym o wartości pH 5,8 i wytrząsa w temperaturze 37°C przez 2 godziny, a następnie przemywa trzykrotnie porcjami po 50 cm³ 0,1 M buforu fosforanowego o wartości pH 7,8. Uzyskuje się około 16 cm³ upakowanych kuleczek immobilizowanych komórek o aktywności amidazy penicylinowej 0,65 j/cm³. Metodą miareczkowania za pomocą fenylometrylosulfonylofluorku stwierdzono, że preparat zawiera 158 pmoli amidazy/cm³, natomiast komórki natywne użyte do immobilizacji — 1720 pmoli amidazy/cm³ biomasy (rys. 4). Wyliczony z tych wartości współczynnik immobilizacji dla absolutnej ilości amidazy wynosi 0,872.

Przykład II. Otrzymywanie immobilizowanych komórek *Escherichia coli* w postaci granulek.

Do 10 g biomasy komórkowej ochłodzonej lodem, zawieszonej w 10 ml 0,2 M buforu fosforanowego o wartości pH 5,8, wkrapla się 20 ml 30% roztworu akryloamidu i 3% dwuallilodwuamidu kwasu winowego, a następnie zawieszoną miesza się z 1 ml 10% roztworu nadsiarczuanu amonowego i 1 ml 10% roztworu tetrametyloetylenodwuaminy. Uzyskaną zawieszoną szybko wysycha się azotem i pozostawia w temperaturze 25°C przez 30 minut. Uzyskany żel przeciera się przez sito uzyskując granulki wielkości 0,2–0,4 mm, które po przemyciu 0,1 M buforem fosforanowym o wartości pH 5,8 miesza się przez 2 godziny w temperaturze 37°C z 4 objętościami 2% aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze fosforanowym o wartości pH 5,8. Następnie granulki przemywa się trzykrotnie 0,1 M buforem fosforanowym o wartości pH 7,8.

Przykład III. Otrzymywanie immobilizowanych komórek *Escherichia coli*, poddawanych działaniu aldehydu glutarowego przed immobilizacją.

10 g biomasy komórek miesza się w temperaturze 37°C przez 2 godziny z 4 objętościami 2%

roztworu aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze fosforanowym o wartości pH 5,8. Następnie komórki przemywa się 0,1 M buforem fosforanowym o wartości pH 5,8 i używa do immobilizacji sposobem opisanym w przykładzie I lub II. Uzyskane kuleczki lub granulki żelu przemywa się 0,1 M buforem fosforanowym o wartości pH 7,8.

Przykład IV. Hydroliza penicyliny G w reaktorze periodycznym.

20 ml kulistych granulek żelu poliakryloamidowego z immobilizowanymi komórkami *Escherichia coli* miesza się w temperaturze 37°C z roztworem 0,8 g soli potasowej penicyliny G w 60 ml 0,03 M fosforanu potasu (wartość pH 7,8). Wartość pH utrzymuje się na stałym poziomie za pomocą 0,5 N roztworu KOH przy użyciu automatycznego titratora. W początkowym okresie hydrolizy zużycia KOH oraz uwalnianie się kwasu 6-aminopenicylanowego jest funkcją liniową w zależności od czasu. Po 6 godzinach reakcji zużywa się łącznie 2 mmole KOH (92%) i równocześnie uwalnia się 1,9 mmola kwasu 6-aminopenicylanowego (87,5 %). Po odsączeniu granulki żelu ponownie używa się do hydrolizy penicyliny G, natomiast z przesączu wydziela się kwas 6-aminopenicylanowy znanymi metodami.

Przykład V. Hydroliza penicyliny G w reaktorze fluidalnym.

Przez 20 ml kuleczek żelu z immobilizowanymi komórkami *Escherichia coli* w kolumnie o wymiarach 1,7x30 cm w temperaturze 37°C przepompowuje się 0,05 M roztwór penicyliny G w 0,02 M buforze fosforanowym o wartości pH 7,5 (fosforan potasu) w ilości 100 ml z szybkością 12 ml/minutę. W tych warunkach granulki żelu utrzymywane są w stanie fluidacji. Wypływający z kolumny roztwór jest przetłaczany do oddzielnego naczynia, w którym wartość pH utrzymuje się w granicach

7,8—8,0 przez dodawanie 0,5 N roztworu KOH z automatycznego titratora, i ponownie zawracany na kolumnę. Po zużyciu około 4,5 mmola KOH, co odpowiada około 90% hydrolizie penicyliny G, roztwór oddziela się od żelu i z supernatantu wydziela kwas 6-aminopenicylanowy, a kuleczki żelu używa do następnej hydrolizy.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania preparatu enzymatycznego, służącego do otrzymywania kwasu 6-aminopenicylanowego przez hydrolizę benzylopenicyliny w środowisku wodnym przy wartości pH 6,0—9,0, polegający na tym, że amidazę penicylinową immobilizuje się w żelu poliakryloamidowym usiecianym za pomocą dwuallilodwuamidu kwasu dwukarboksylowego i poddaje działaniu aldehydu glutarowego, znamienny tym, że immobilizacji poddaje się całe komórki drobnoustroju produkujące amidazę penicylinową, korzystnie komórki *Escherichia coli*.

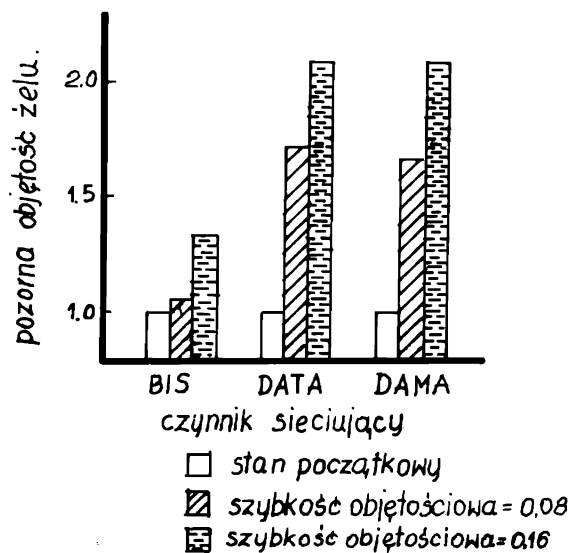
2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że komórki drobnoustroju immobilizuje się przez polimeryzację akryloamidu w zawiesinie komórek w obecności dwuallilodwuamidu kwasu dwukarboksylowego oraz katalizatora i inicjatora polimeryzacji.

3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, znamienny tym, że jako dwuallilodwuamid kwasu dwukarboksylowego stosuje się dwuallilodwuamid kwasu winowego lub kwasu malonowego.

4. Sposób według zastrz. 2, znamienny tym, że komórki drobnoustroju poddaje się działaniu aldehydu glutarowego przed polimeryzacją.

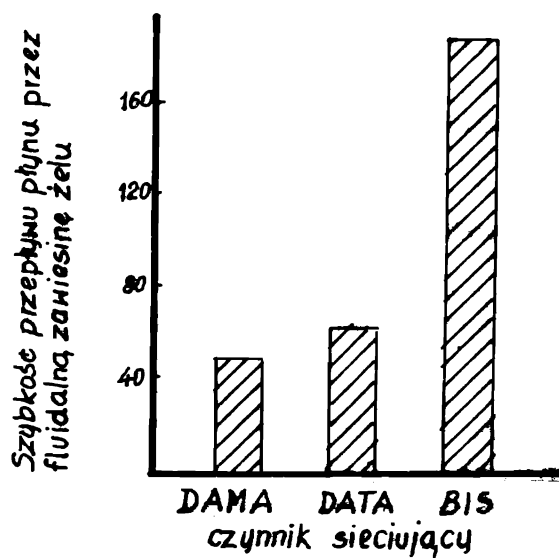
5. Sposób według zastrz. 2, znamienny tym, że komórki drobnoustroju poddaje się działaniu aldehydu glutarowego po polimeryzacji.

Wpływ czynnika sieciującego immobilizowanych komórek na pozorną objętość żelu w reaktorze fluidalnym.

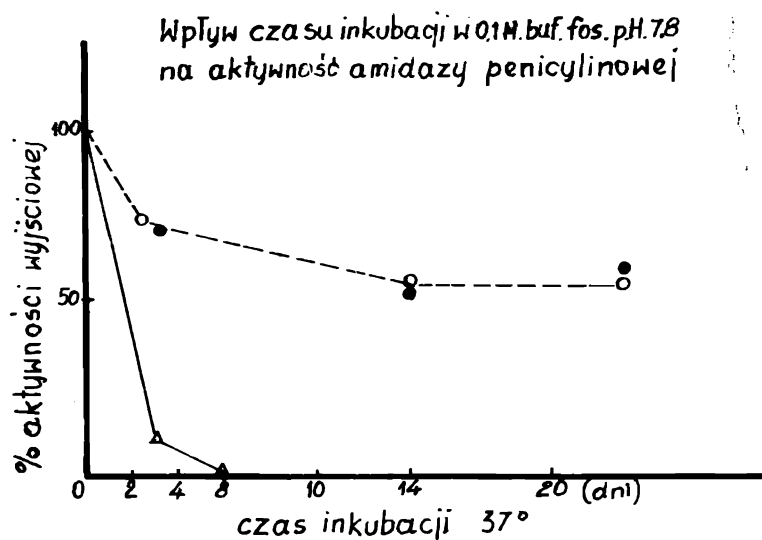


Rys. 1

Wpływ czynnika sieciującego immobilizowanych komórek na szybkość przepływu buforu przez fluidalną zawiesinę.
(szybkość objętościowa dla wszystkich żeli = 0,08)

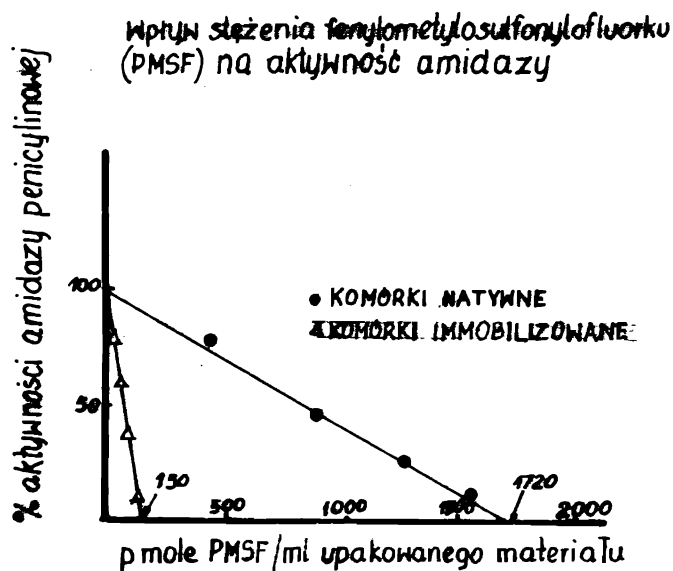


Rys. 2



- komórki immob. traktowane aldehydem glutarowym.
- komórki traktowane aldehydem glutarowym i immobilizowane
- △ komórki immob. nie traktowane aldehydem glutarowym.

Rys. 3



Rys. 4