



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 12.02.1969 (P. 131695)

Pierwszeństwo: 15.02.1968 Wielka Brytania

Zgłoszenie ogłoszono: 26.02.1973

Opis patentowy opublikowano: 15.12.1976

MKP C07g 7/028

Int. Cl². C07G 7/028

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Aktiebolaget Astra, Södertälje (Szwecja)

Sposób wytwarzania acylazy penicylinowej

1

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania, oczyszczania i wyosabniania enzymu z *Escherichia coli*, mającego zdolność odszczepiania bocznych łańcuchów niektórych penicylin, tworząc przy tym kwas 6-aminopenicylanowy.

Wiadomo, że wiele mikroorganizmów, zarówno bakterii, jak i grzybów, wytwarza enzymy, które mogą hydrolizować wiązanie amidowe w pozycji 6 penicylin. Enzymy te określa się ogólnie nazwą acylaz lub amidaz penicylinowych (J.M.T. Hamilton-Miller *Bacteriological Reviews* 30 (1966) 761). Przy wytwarzaniu kwasu 6-aminopenicylanowego na skalę przemysłową stosuje się korzystnie zawiesiny komórek *E. coli*, zawierające acylazę lub amidazę.

Metody te mają jednak szereg wad. Ponieważ enzym znajduje się przeważnie wewnątrz komórek, przeto, aby mógł działać na penicylinę, musi ona w pierw przeniknąć do wnętrza komórek, co sprawia, że cały proces jest powolny. Poza tym użyty szczep może zawierać również inne enzymy, które inaktywują penicylinę lub utworzony kwas 6-aminopenicylanowy rozszczepiając wiązanie β -laktamowe, albo zanieczyszczają komórki organizmami, które wytwarzają wspomniane enzymy. Ponieważ zaś acylaza stanowi tylko bardzo małą część zawartości komórek, przeto proces, w którym stosuje się całe organizmy, ma tę niedogodność, że duża ilość materiału opóźnia jego przebieg.

Inną wadą znanych metod, w których stosuje się

2

mikroorganizmy w całości, jest to, że do szeregu czynności niezbędnych w celu otrzymania półsyntetycznych penicylin, trzeba dodać jeszcze czynność oddzielania, na przykład odsączania, organizmów od cieczy reakcyjnej, w której pierwotny łańcuch boczny został odszczepiony od biosyntetycznych penicylin. Oprócz tego traci się pewne ilości kwasu penicylanowego przez adsorpcję w komórkach oraz na skutek rozkładu pod wpływem produktów przemiany materii w komórkach. Poważny problem stanowi również oddzielanie kwasu 6-aminopenicylanowego od innych produktów, powstających podczas procesu odszczepiania bocznego łańcucha.

Jak wiadomo (Batchelor i in. *Lancet* I (1968) 1175), kwas 6-aminopenicylanowy, otrzymany znaną metodą przy użyciu całych komórek mikroorganizmów, może zawierać białkowe zanieczyszczenia zdolne do wywoływania niebezpiecznych reakcji alergicznych u ludzi i zwierząt. Penicyliny, otrzymane z takiego zanieczyszczonego kwasu 6-aminopenicylanowego, mogą zawierać wymienione zanieczyszczenia, powodujące wiele reakcji alergicznych, zaobserwowanych przy stosowaniu takich penicylin (G.T. Stewart, *Amer. Heart. J.* 1968, 429).

W celu usunięcia tych zanieczyszczeń, kwas 6-aminopenicylanowy lub wytworzone zeń penicyliny należy poddawać dodatkowym procesom oczyszczania, na przykład przez dializę lub filtrację żelową (kanadyjski opis patentowy nr 771 662).

Podczas tych dodatkowych zabiegów traci się zna-

czne ilości kwasu 6-aminopenicylanowego lub penicyliny, czego dowodzi wydajność benzylopenicyliny, wynosząca przy metodzie podanej w brytyjskim opisie patentowym nr 1 078 847 tylko 12% lub wydajność fenoksymetylopenicyliny (brytyjski opis patentowy nr 1 114 311) wynosząca 56% wydajności teoretycznej.

Wszystkich tych niedogodności unika się, stosując nie zawierający komórek, to znaczy oczyszczony preparat enzymowy otrzymany sposobem według wynalazku. Kwas 6-aminopenicylanowy, wytworzony przy użyciu takiego oczyszczonego preparatu enzymowego do rozerwania wiązania amidowego w pozycji 6 penicylin, otrzymuje się z dobrą wydajnością i zasadniczo wolny od białkowych zanieczyszczeń. Przez acylowanie takiego kwasu otrzymuje się z dobrą wydajnością i bez dalszego oczyszczania penicyliny nie powodujące schodzeń alergicznych.

W literaturze znajduje się szereg wzmianek o próbach wytwarzania oczyszczonych preparatów enzymowych z szczepów *E. coli*. Jedną z tych metod Borkar i in. *Hindustan Antibiotics Bull.* 4, (1961) 48, 152 polega na traktowaniu zawiesiny komórek w fosforanowej substancji buforowej falami ultradźwiękowymi, a następnie frakcjonowane strącanie i chromatografowanie kolumnowe.

W wyniku tych procesów uzyskuje się 25-krotne oczyszczenie. Inny sposób (Holt i Stewart, *Nature* 201 (1964) 824) polega na osuszaniu przez wymrażanie i dializowaniu odsączonej brzeczki hodowli. Metoda ta nie daje dobrych wyników, gdyż otrzymuje się produkt zanieczyszczony. Lepsze wyniki, a mianowicie oczyszczenie 40-krotne uzyskuje się przy oczyszczaniu enzymu *E. coli* metodą strącania siarczanu amonowego i adsorpcję żelową za pomocą fosforanu wapniowego oraz chromatografowanie na celulozie DEAE wyciągu z komórek *E. coli* w fosforanowej substancji buforowej, poddanego działaniu fal ultradźwiękowych (Szentirmai, *Acta Microb. Acad. Scient. Hung.* 12 (1966) 395).

Sakaguchi i Marao (japoński opis patentowy nr 26050/64) otrzymali z niewielką wydajnością oczyszczony preparat enzymowy z *E. coli*, ekstrahując komórki boranową substancją buforową w ciągu dłuższego okresu czasu lub w ciągu krótszego czasu przy zastosowaniu działania fal ultradźwiękowych. Z wyciągu można następnie otrzymać enzym w postaci stałej, po strąceniu siarczanem amonowym, dializie i suszeniu przez wymrażanie. Johnson i Hardcastle (amerykański opis patentowy nr 3 297 546) otrzymali roztwór enzymu z *E. coli* przez traktowanie kultury komórkowej związkiem o wzorze MX_2 , przeważnie $Ca(NO_3)_2$, a następnie czwartorzędowym związkiem amonowym, odsączenie komórek i mieszanie ich z wodą w ciągu kilku godzin i odsączenie zawiesiny oraz oczyszczanie przesączu węglem aktywowanym.

Wiadomo również, że enzymy zawarte w komórkach bakterii mogą być wyzwalane przez wytłaczanie zawiesin komórek pod wysokim ciśnieniem przez mały otwór. Duerre i Ribl (Appl. Microbiol. 11 (1964) 467) przy badaniu nie amidazy penicylinowej, lecz innych enzymów występujących w *E. coli*, stwierdzili, że w celu uzyskania maksymalnego wy-

zwalania enzymów trzeba stosować ciśnienie powyżej 1050 atmosfer. Jednakże przy stosowaniu tak wysokiego ciśnienia ulegają również rozerwaniu ścianki komórek i znaczna ich część przechodzi do roztworu. Frazer (*Nature* 167 (1951) 33) stwierdził, że komórki *E. coli* ulegają rozrywaniu na małą skalę przy wytłaczaniu ich z bomby pod ciśnieniem gazu, wynoszącym 35–63 atm.

W odróżnieniu od podanych wyżej znanych metod stwierdzono obecnie, że wewnątrzkomórkową acylazę penicylinową można ekstrahować z *E. coli* za pomocą wody na dużą skalę, jeżeli komórki lub ich zawieszinę w wodzie albo w mieszaninie wody z rozpuszczalnikami organicznymi podda się działaniu ciśnienia wynoszącego co najmniej 35 atm, lecz nie przekraczającego ciśnienia, przy którym następuje rozrywanie komórek i następnie nagle rozprężą.

Zgodnie z tym wynalazek umożliwia wytwarzanie preparatu acylazy penicylinowej z *E. coli* na drodze znanej fermentacji szczepu *E. coli* wytwarzającego ten enzym, oddzielaniu cieczy z hodowli i szybkiego wytłaczania materiału komórkowego przez wąski otwór lub szczelinę pod ciśnieniem co najmniej 35 atm, lecz nie wyższym od ciśnienia, przy którym zachodzi nadmierne rozrywanie komórek. Stwierdzono, że takie nadmierne rozrywanie komórek nie zachodzi przy stosowaniu ciśnienia wynoszącego 210 atm. Wytłoczony materiał miesza się z wodą, ewentualnie z dodatkiem organicznego rozpuszczalnika i/lub zasady, na przykład wodorotlenku sodowego lub trójetiloaminy, w celu rozpuszczenia enzymu.

Według wynalazku, oddzielanie cieczy z hodowli i wytłaczanie materiału komórkowego przeprowadza się równocześnie za pomocą separatora odśrodkowego, wyposażonego w urządzenie samooczyszczające i pracującego w temperaturze 0–50°C, korzystnie 15–40°C, przy czym oddzielany materiał komórkowy wytłacza się okresowo w ciągu 0,05–1,0 sekundy, a korzystnie 0,1–0,5 sekundy, przez szczelinę na obwodzie, mającą szerokość 0,1–1,5 mm, a korzystnie 0,3–0,7 mm, stosując ciśnienie 35–140 atm, korzystnie 63–77 atm.

W razie potrzeby brzeczkę nasycą się organicznym rozpuszczalnikiem o małej rozpuszczalności w wodzie, na przykład octanem butylu, octanem izobutylu lub octanem amylu, w celu zabicia mikroorganizmu i ułatwienia procesu rozdzielania. W razie potrzeby można przemywać materiał komórkowy w separatorze wodą. Wytłoczony materiał komórkowy miesza się w temperaturze 10–50°C, a korzystnie 20–40°C, w ciągu 0,10–5,0 godzin, niekiedy korzystnie 0,25–3,0 godzin, a zwłaszcza 0,25–1,0 godziny, w mieszalniku o sprawnie działającym mieszadle, w celu rozpuszczenia enzymu, ewentualnie z dodatkiem 1,0–5,0% organicznego rozpuszczalnika nie mieszającego się z wodą, na przykład ketonu metyloizobutylowego, octanu butylu, octanu izobutylu, octanu amylu, benzenu, toluenu lub chloroformu.

W celu ułatwienia ekstrakcji enzymu z wytłoczonego materiału komórkowego można do mieszaniny dodać nieorganicznej zasady, na przykład wodorotlenku sodowego, potasowego lub amoniaku, albo trzeciorzędowej zasady organicznej, na przykład trójetiloaminy lub N-etylopiperydiny, doprowa-

dając wartość pH mieszaniny do 6,5–9,0, a korzystnie do 7,0–8,5.

Otrzymany w ten sposób roztwór enzymu, ewentualnie po rozcieńczeniu wodą, uwalnia się od pozostałego materiału komórkowego i innych stałych zanieczyszczeń za pomocą znanych metod, na przykład odsączania lub odwirowywania albo obu tych metod ewentualnie z dodatkiem pomocniczych środków odbarwiających, klarujących lub ułatwiających sączenie, na przykład węgla aktywowanego, tlenku glinowego, sproszkowanej celulozy, ziemi okrzemkowej, lub innych stałych środków o niewielkiej zdolności adsorbowania.

Korzystnie jest oddzielać większą część materiału komórkowego przez odwirowanie i następnie przesączać otrzymany odciek. W celu dodatkowego oczyszczania enzymu zakwasza się wodny roztwór do wartości pH=3,0–6,0, korzystnie 4,0–5,0, odsącza wytrącony, nieaktywny osad i ponownie doprowadza wartość pH do jej poprzedniej wysokości.

Acylazę penicylinową, zawartą w uwolnionym od komórek i ewentualnie częściowo oczyszczonym, wodnym roztworze, można wytrącać przez traktowanie tego roztworu środkami takimi, jak tanina, które z substancjami białkowymi wytwarzają trudno rozpuszczalne kompleksy. Korzystnie jest, jeżeli roztwór enzymu o wartości pH=4–6, a zwłaszcza 4,5–5,5, traktuje się taniną w takiej ilości, aby jej stężenie wyniosło 300–900 części/milion, w obecności środków wytwarzających wiązania chelatowe, na przykład kwasu etylenodwuaminocteroocetowego, w celu wytworzenia związków kompleksowych z jonami żelaza.

Wytworzony kompleks enzymu z taniną można wyosabniać w znany sposób, na przykład przez odsączanie lub odwirowywanie. Można go przemywać, suszyć i odwadniać na przykład przez wymrażanie lub przez traktowanie organicznymi rozpuszczalnikami mieszającymi się z wodą, na przykład acetonem. Można też stosować ten kompleks bezpośrednio do usuwania bocznego łańcucha w penicylinach, na przykład w benzylopenicylinie, jak to omówiono w brytyjskim zgłoszeniu patentowym nr 33734/67.

Acylazę, zawartą w kompleksie strąconym za pomocą taniny, przeprowadza się do wodnego roztworu przez rozpuszczenie związku kompleksowego w wodzie przy wartości pH=7–9, korzystnie 7,5–8,5. Można też potraktować kompleks mieszaniną wody i nie mieszającego się z wodą rozpuszczalnika, na przykład n-butanolu, przy wartości pH=4–7, a korzystnie 4,5–5,5.

Trzecia wreszcie metoda oddzielania taniny od acylazy polega na tym, że kompleks enzymu z taniną miesza się z wodą i powstałą zawiesinę przepuszcza się przez anionowy wymienniczk jonowy, na przykład dwuetyloaminoetylocelulozę, który wiąże taninę, a enzym rozpuszcza się w wodzie. Ilość wody niezbędna w operacjach jest znacznie mniejsza od tej, jaka znajduje się w pierwotnych roztworach enzymu, toteż w ten sposób uzyskuje się znaczny wzrost aktywności enzymatycznej roztworów.

Według wynalazku, acylazę penicylinową zawartą w roztworze można stężyć i oczyszczać za pomocą wymienniczk jonowego. Korzystnie jest adsorbo-

wać enzym na kationowym wymienniczk jonowym, na przykład znanym pod nazwą SE-Sephadex lub CM-Sephadex lub na karboksymetylocelulozie, przepuszczając roztwór enzymu, doprowadzony do wartości pH=3,5–6, a korzystnie 4,0–5,0, przez kolumnę wymienniczk. Można też wymienniczk dodawać do roztworu i mieszać. Z wymienniczk jonowego eluuje się acylazę przy wartości pH=6,0–8,0 za pomocą słabych roztworów buforowych, na przykład 0,2 M roztworu octanu amonowego lub octanu trójhydroksymetyloammonowego.

W celu otrzymania bardziej czystych preparatów enzymowych, jony nieograniczone i zanieczyszczenia o małych cząsteczkach usuwa się z roztworów enzymu za pomocą dializy wodą. Można też roztwory enzymowe, w razie potrzeby po stężeniu ich do wartości 25–100 mg substancji stałej na I litr, poddać filtracji żelowej. Stężenie tych roztworów prowadzi się w temperaturze poniżej 50°C.

Roztwory enzymu, otrzymane w jednym z opisanych wyżej stadiów procesu, nadają się bezpośrednio do odszczepiania bocznych łańcuchów naturalnych penicylin, zwłaszcza do usuwania bocznego łańcucha w benzylopenicylinie.

Zgodnie z wynalazkiem, acylazę w stanie stałym wyosabnia się z wodnego roztworu przez wymrażanie do sucha, suszenie metodą fluidyzacji lub rozpylania, albo też za pomocą stężania pod zmniejszonym ciśnieniem lub strącania znanymi metodami. W wyniku tych procesów otrzymuje się stały enzym o wysokiej aktywności właściwej, nadający się do magazynowania i przenoszenia. Stosowanie takiego stałego, rozpuszczalnego w wodzie preparatu enzymowego daje wiele korzyści technicznych, gdyż umożliwia pracę z roztworami o znacznie większym stężeniu niż stężenie, jakie osiąga się przy znanej metodzie zawieszin komórek. Szczególnie korzystne jest wyosabnianie enzymu za pomocą wymrażania do sucha roztworu enzymu w temperaturze –10°C do 50°C, korzystnie 0–30°C lub suszenie fluidyzacyjne w strumieniu powietrza w temperaturze 10–55°C, korzystnie 35–45°C.

Oczyszczone preparaty enzymowe, otrzymane sposobem według wynalazku, stanowią dobry materiał wyjściowy do chemicznego przekształcania enzymu, w wyniku czego otrzymuje się produkty o lepszych właściwościach, a mianowicie aktywniejszych i/lub lepiej nadających się w technice. Enzym ten może reagować z materiałami o budowie polimerycznej, na przykład z polisacharydami traktowanymi bromkiem cyjanu, dając produkty, w których enzym jest związany z podstawą polimeru.

Produkty takie zachowują aktywność enzymatyczną, co ma tę zaletę przy stosowaniu ich do rozszczepiania penicylin, że można je łatwo oddzielać od roztworu reakcyjnego, na przykład przez odsączenie. Polimeryczne preparaty enzymowe można także stosować w kolumnach do ciągłego wytwarzania kwasu 6-aminopenicylanowego, polegającego na przepuszczaniu roztworu penicylin przez kolumnę.

Wynalazek jest bliżej wyjaśniony w niżej podanych przykładach, w których omówiono wytwarzanie i oczyszczanie produktu enzymatycznego nie zawierającego komórek.

Przykład I. Wytwarzanie komórek bakterii *E. coli*. 3 kg namoku kukurydzowego, 135 ml oleju sojowego, 12 ml parafiny i 3 ml cetanolu w 150 litrach wody miesza się, dodaje 165 ml 45% wodorotlenku sodowego w celu doprowadzenia wartości pH mieszaniny do 6,0 i sterylizuje w temperaturze 124°C w ciągu 30 minut w posiewowym zbiorniku fermentacyjnym. Następnie roztwór zaszczepia się 100 ml 20–24 godzinnej kultury *E. coli* (Astra 1339) i prowadzi hodowlę w temperaturze 25°C, napowietrzając i mieszając w ciągu 18 godzin.

300 kg namoku kukurydzowego, 13,8 kg oleju sojowego, 1,22 kg parafiny, 0,3 kg cetanolu, 21 kg kwasu fenyllooctowego i 112 kg chlorku sodowego w 14000 litrach wody traktuje się 40 kg 45% roztworu wodorotlenku sodowego, doprowadzając wartość pH roztworu do 6,6, po czym roztwór sterylizuje się w zbiorniku fermentacyjnym w temperaturze 124°C w ciągu 30 minut. Następnie chłodzi się roztwór i zaszczepia przygotowaną wyżej kulturę i poddaje hodowli w temperaturze 25°C, mieszając i napowietrzając. Po upływie 24 godzin od zaszczepienia, gdy wartość pH wzrosła do 8,2, zabija się komórki bakterii przez dodanie 180 litrów octanu butylu i mieszaninę chłodzi się.

Przykład II. Wyosabnianie i oczyszczanie acylazy.

a) Mieszaninę otrzymaną w przykładzie I odwirowuje się w separatorze typu De Laval BRPX 213-35 S, wyposażonym w urządzenie do samooczyszczania. Pastę komórek bakterii zbiera się w porcjach po 100–120 kg i do każdej porcji dodaje 3% ketonu metyloizobutyloвого i mieszaninę homogenizuje za pomocą mieszalnika systemu Ultra Turrax, typ T 110/2M w ciągu 25 minut. Otrzymuje się łącznie 325 kg masy.

Analiza enzymu w różnych stadiach procesu daje następujące wyniki, wyrażone w jednostkach umownych, przy czym 1 taka jednostka (1 j) oznacza ilość enzymu zdolną do rozszczepienia w ciągu 1,5 godziny, przy wartości pH=8,5 i w temperaturze 37°C takiej ilości benzylopenicyliny, która odpowiada 1 mg kwasu 6-aminopenicylanowego:

wytwarzanie na drodze hodowli fermentacyjnej	5 j/ml
odciek	0,33 j/ml
odciek z separatora	0,28 j/ml
pasta komórek bakterii	212 j/g
ciecz w paście przed homogenizacją	75 j/g
ciecz w paście po homogenizacji	123 j/g.

b) Pastę komórek bakterii, otrzymaną w przykładzie IIa, stosuje się do badania rozpuszczania enzymu. Do 100 g pasty dodaje się 100 ml odjonizowanej wody. Otrzymaną zawiesinę, mającą wartość pH=5,9, poddaje się następującym próbom.

1. Odwirowuje się zawiesinę przy 5000 G (siła odśrodkowa mierzona jako wielokrotność przyspieszenia ziemskiego) w ciągu 20 minut i określa aktywność enzymatyczną w odcieku.

2. Zawiesinę homogenizuje się w mieszalniku Ultra Turrax w ciągu 5 minut, ochładzając próbkę w kąpiel lodowej, w celu niedopuszczenia, aby temperatura próbki wzrosła powyżej 35°C. Następnie odwirowuje się próbkę, jak wyżej w punkcie 1 i określa aktywność odcieku.

3. Do zawiesiny dodaje się, mieszając, wodorotlenku sodowego w celu doprowadzenia wartości pH do 8,5, po czym próbkę homogenizuje się i odwirowuje, jak wyżej podano oraz oznacza aktywność odcieku.

4. Do zawiesiny dodaje się 3% ketonu metyloizobutyloвого i nastawia wartość pH jak w punkcie 3, po czym homogenizuje się, odwirowuje i oznacza aktywność w odcieku.

Wyniki prób rozpuszczania są następujące:

	Jednostek/gram	% całości
zawiesina bakterii	106	100
odciek otrzymany w próbie 1	29	28
odciek otrzymany w próbie 2	62	59
odciek otrzymany w próbie 3	73	69
odciek otrzymany w próbie 4	83	78

c) 175 kg zhomogenizowanej pasty bakteryjnej o aktywności 190 j/g rozcieńcza się 175 kg wody i do mieszaniny dodaje, mieszając, 22,7 kg Hyflo, 22,7 kg Celite 505 i 10,2 kg Fibraflo, po czym oddziela się fazę wodną za pomocą filtru typu Funda i osad przemywa 50 litrami wody. Otrzymuje się 290 kg połączonych roztworów o aktywności 48 j/g.

d) 1 kg zhomogenizowanej pasty o aktywności 212 j/g rozcieńcza się 2,0 litrami wody, dodaje 220 ml 0,5 n roztworu wodorotlenku sodowego w celu doprowadzenia wartości pH do 8,5 i miesza w temperaturze 20°C w ciągu 30 minut. Następnie odwirowuje się mieszaninę z siłą odśrodkową 13200 G w ciągu 30 minut w temperaturze 0°C, dekantuje odciek i przesącza go, otrzymując 2,7 kg roztworu o aktywności 50 j/g.

Ponowne zmieszanie dwukrotne osadu z 1 litrem wody w ciągu 5 minut przy wartości pH=8,5 i odwirowanie daje dodatkowo 2 kg roztworu enzymu o aktywności 11 j/g. Łączna wydajność acylazy mierzona aktywnością wynosi 74% wydajności teoretycznej.

e) 2 kg klarownego roztworu acylazy o aktywności 50 j/g, otrzymanego w sposób, opisany w przykładzie II d, poddaje się liofilizacji, otrzymując 98,5 g stałej acylazy o aktywności 950 j/g.

f) 2 kg klarownego roztworu acylazy, o aktywności 50 j/g, otrzymanego w sposób, opisany w przykładzie II d, poddaje się suszeniu metodą rozpylania, otrzymując 92 g stałej acylazy o aktywności 920 j/g.

g) 1 kg klarownego roztworu acylazy, o aktywności 52 j/g, otrzymanego w sposób, opisany w przykładzie II d, poddaje się w ciągu 8 godzin procesowi dializy za pomocą wody wodociągowej. Otrzymany roztwór liofilizuje się, otrzymując 20,5 g stałej acylazy o aktywności 2400 j/g.

h) 245 kg klarownego roztworu acylazy o aktywności 48 j/g, otrzymanego w sposób, opisany w przykładzie II c, miesza się i traktuje 2,2 kg 9 m kwasu octowego, w celu uzyskania wartości pH=4,5. Kontynuuje się mieszanie w ciągu 1 godziny i następnie przesącza mieszaninę, do przesącza dodaje mieszając 4,5 kg 7 m wodorotlenku amonowego, w celu doprowadzenia do wartości pH=8,0. Po upływie 1 godziny mieszaninę przesącza się i do przesącza dodaje 2,0 kg 9 m kwasu octowego, doprowadzając wartość pH do 5. Otrzymuje się 220 kg roztworu o aktywności 47,5 j/g.

i) 500 g odcieku o aktywności 52 j/g, otrzymanego w sposób, opisany w przykładzie II d, doprowadza się do wartości pH i miesza w ciągu 15 minut w temperaturze 0°C, w celu wytrącenia zanieczyszczeń białkowych. Następnie mieszaninę odwirowuje się, alkalizuje przesącz do wartości pH=7,5, otrzymując czysty roztwór o aktywności 40 j/g. 500 g tego roztworu dializuje się wodą pitną w ciągu nocy i wymraża do sucha, otrzymując 4 g produktu o aktywności 4900 j/g.

j) 1 kg homogenizowanej pasty bakterii o aktywności 128 j/g odwirowuje się przy 13200 G w ciągu 30 minut, w temperaturze 0°C. 500 g odcieku o aktywności 80 j/g dekantuje się, przesącza i przesącz stosuje do enzymatycznego rozszczepiania penicyliny, w celu otrzymania kwasu 6-aminopenicylanowego.

Przykład III. Wytwarzanie kompleksu acylazy z taniną.

185 kg roztworu acylazy, frakcjonowanego w sposób opisany w przykładzie II h, mającego aktywność 47,5 j/g, miesza się i traktuje 50 g kwasu etylenodwuamino-czterooctowego, a następnie roztworem 166 g taniny i 55 g siarczynu sodowego w 5,5 litra wody. Mieszaninę miesza się w ciągu 1 godziny z 1,5 kg Celite 505 i 700 g siarczynu sodowego i przesącza, otrzymując 3950 g osadu, stanowiącego kompleks acylazy z taniną i mającego aktywność 1930 j/g.

Przykład IV. Otrzymywanie acylazy z kompleksu taninowego.

a) 30,4 g wilgotnego osadu o aktywności 1930 j/g, otrzymanego w sposób opisany w przykładzie III, traktuje się 30 ml acetonu, ochłodzonego do temperatury -10°C do -30°C. Aceton dodaje się powoli mieszając. Po rozpuszczeniu się powstałego osadu dodaje się jednorazowo dalsze 200 ml ochłodzonego acetonu i odsącza. Osad przemywa się zimnym acetonem i suszy w powietrzu w temperaturze pokojowej w ciągu nocy. Otrzymuje się 15,4 g produktu o aktywności 3650 j/g.

b) 3750 g wilgotnego kompleksu acylazy z taniną, mającego aktywność 1930 j/g, otrzymanego w sposób opisany w przykładzie III, miesza się z 5 litrami 0,1 molowego roztworu octanu amonowego o wartości pH=5,0 i 2,5 litrami butanolu. Do mieszaniny dodaje się 50 g siarczynu sodowego i tyle kwasu octowego, aby utrzymać wartość pH=5,0. Miesza się w ciągu 20 minut i odsącza. Otrzymuje się 6650 ml fazy wodnej o aktywności 800 j/ml.

c) 1000 ml roztworu acylazy o aktywności 48 j/ml, frakcjonuje się w sposób podany w przykładzie II h i traktuje taniną, jak opisano w przykładzie III. Kompleks taniny z acylazą odsącza się i miesza z 100 ml roztworu buforowego o wartości pH=8,0, zawierającego 0,1 m roztworu octanu amonowego. Miesza się w ciągu 1 godziny, utrzymując wartość pH=8,0 i odsącza. Otrzymuje się 100 ml roztworu acylazy o aktywności 220 j/ml.

d) Wilgotny kompleks taniny z acylazą miesza się z 100 ml roztworu buforowego, jak w przykładzie IV c i traktuje 2 g celulozy DEAE, miesza w ciągu 15 minut i odsącza, otrzymując 90 ml roztworu acylazy o aktywności 494 j/ml.

e) 36,6 g wilgotnego kompleksu taniny z acylazą,

o aktywności 1250 j/g, otrzymanego w sposób opisany w przykładzie III, miesza się z 150 ml 0,2 m octanu amonowego jako roztworu buforowego o wartości pH=8,0 i nastawia wartość pH mieszaniny na wartość 8,0. Miesza się w ciągu 10 minut, dodaje 60 ml butanolu, a następnie zakwasza 9 m kwasem octowym do wartości pH=5,0. Miesza się dalej w ciągu 10 minut i odsącza, otrzymując 166 ml fazy wodnej o aktywności 140 j/ml.

Przykład V. Liofilizacja osadu taniny z acylazą 86,1 g wilgotnego kompleksu taniny z acylazą, o aktywności 1600 j/g, otrzymanego w sposób opisany w przykładzie III, chłodzi się do temperatury -30°C i suszy w temperaturze 25°C pod ciśnieniem 0,1—0,2 mm Hg. Otrzymuje się 28,5 g suchego produktu o aktywności 2340 j/g.

a) Suszenie metodą rozpyłową 5 litrów klarownego roztworu acylazy o aktywności 47,5 j/ml, otrzymanego w sposób opisany w przykładzie II h, rozpyła się w powietrzu o temperaturze 110—115°C przy wlocie i o temperaturze 70—75°C przy wylocie. Proces prowadzi się w ciągu 1 godziny, otrzymując 85 g produktu o aktywności 380 j/g.

b) Suszenie metodą fluidyzacji, 100 g sproszkowanej celulozy miesza się z 200 g roztworu acylazy o aktywności 162 j/g, otrzymanego w sposób opisany w przykładzie IV b. Otrzymaną mieszaninę fluidyzuje się w strumieniu powietrza w temperaturze 40°C w ciągu 90 minut. Otrzymuje się 93,2 g suchego proszku o aktywności 284 j/g.

Przykład VI. Oczyszczanie acylazy metodą chromatograficzną przez wymianę jonów.

a) 5000 ml roztworu acylazy o aktywności 48 j/ml, otrzymanego w sposób opisany w przykładzie II c, zakwasza się 9 m kwasem octowym do wartości pH=4,6 i pozostawia na noc, a następnie przesącza na zimno i klarowny przesącz kieruje na kolumnę jonitową o średnicy 8 cm i długości 15 cm, zawierającą preparat sulfoetylowy Sephadex C50 w 0,1 m odcianie amonowym o pH=4,6.

Kolumnę wymywa się 650 ml octanu amonowego jako substancji buforowej o pH=4,6. Acylazę eluuje się 0,2 m roztworem octanu amonowego o wartości pH=8,0 jako substancję buforową, otrzymując 640 ml produktu o aktywności 326 j/ml.

b) 5550 ml oczyszczonego roztworu acylazy o aktywności 800 j/ml, otrzymanego w sposób opisany w przykładzie IV b, zakwasza się do wartości pH=4,6 i postępując metodą podaną w przykładzie VI a, otrzymuje się 2350 ml produktu o aktywności 1610 j/ml.

c) 250 ml roztworu oczyszczonego w sposób podany w przykładzie VI b, mającego aktywność 1610 j/ml, chłodzi się do temperatury -40°C i suszy pod ciśnieniem 0,1—0,2 mm Hg w temperaturze 25°C. Otrzymuje się 2,11 g oczyszczonej acylazy o aktywności 190000 j/g.

d) 230 ml roztworu acylazy, oczyszczonego w sposób podany w przykładzie VI b, mającego aktywność 1610 j/ml, stęża się przez odparowywanie pod obniżonym ciśnieniem do objętości 24 ml. 15 ml otrzymanego koncentratu o aktywności 15000 j/ml wprowadza się na kolumnę o średnicy 2,5 cm i długości 100 cm, wypełnioną preparatem Sephadex G 75 i eluuje dejonizowaną wodą. Otrzymuje się 108

ml roztworu acylazy o aktywności 1710 j/ml. Suszenie tego roztworu przez wymrażanie daje produkt o aktywności 92500 j/g.

e) 72 mg preparatu acylazy, otrzymanego w sposób podany w przykładzie VI a, a następnie wysuszonego przez wymrażanie, rozpuszcza się w 2,7 ml 0,005 m roztworu buforowego o wartości pH=6,30, zawierającego fosforan sodowy i dializuje za pomocą takiego samego roztworu buforowego, a następnie podaje na kolumnę, zawierającą karboksymetylocelulozę. Kolumna ma długość 13,5 cm i średnicę 0,9 cm i jest uprzednio zrównoważona roztworem buforowym. Kolumnę eluuje się następującymi roztworami buforowymi:

0,005 m roztwór fosforanu sodowego o pH=6,30 (około 17 ml)

0,02 roztwór fosforanu sodowego o pH=6,35 (około 17 ml) i 0,1 roztwór fosforanu sodowego o pH=6,35.

Zbiera się frakcje po 1,3 ml i oznacza absorpcję światła przy długości fali 280 milimikronów. Enzym eluuje się całkowicie za pomocą 0,1 m roztworu buforowego, przy czym eluat zawiera tylko 10% pierwotnej zawartości substancji białkowych, zaś około 90% białka nieaktywnego znajduje się w frakcjach eluowanych roztworem buforowym 0,005 m.

f) 100 ml roztworu otrzymanego w sposób, podany w przykładzie II h, dializuje się destylowaną wodą, a następnie 0,005 m roztworem buforowym fosforanu o wartości pH=6,0 w ciągu 24,5 godzin, po czym dodaje się 12,5 mg/ml dwuetyloaminoetylocelulozy, zrównoważonej wspomnianym wyżej roztworem buforowym. Celulozowy wymienniacz jonowy oddziela się po upływie 30 minut, przy czym nie stwierdza się spadku aktywności acylazy, ale absorpcja światła przy długości fali 280 milimikronów wynosi tylko 10% poprzedniej wartości. Następnie adsorbuje się enzym za pomocą karboksymetylocelulozy, traktuje kwasem solnym i płucze lub zrównoważa 0,005 m octanem sodowym o pH=5,5. W obu przypadkach stosuje się różne ilości wymienniacza jonowego, a mianowicie 12,5 mg i 3,2 mg na 1 ml. Po oddzieleniu wymienniacza aktywny enzym eluuje się po zanurzeniu wymienniacza w wodzie i podwyższeniu wartości pH do 6—7 i stężenia jonów przez dodawanie 0,1 m fosforanowego roztworu buforowego. Wydajność wynosi około 80% wydajności teoretycznej.

g) 100 ml roztworu otrzymanego w sposób, opisany w przykładzie II h, dializuje się destylowaną wodą i następnie 0,005 m fosforanowym roztworem buforowym o wartości pH=6,0 w ciągu 22 godzin. Roztwór traktuje się dwukrotnie dwuetyloaminoetylocelulozą w ilości 12,4 mg/ml, zrównoważoną wyżej wspomnianym roztworem buforowym.

Następnie do roztworu dodaje się tego samego wymienniacza jonowego w ilości 13 mg/ml w postaci odmiany wodorotlenowej, przy czym aktywność acylazy nie obniża się. Wymienniacz jonowy oddziela się po upływie 30 minut od chwili jego dodania. Po dodaniu ostatniej porcji pH wzrasta do 8,31. Całkowite zaabsorbowanie enzymu następuje po dodaniu postaci wodorotlenowej wymienniacza w ilości 50 mg/ml przy pH=9,11. Po oddzieleniu wymienniacza jonowego i zdyspergowaniu go w wodzie, eluuje

się enzym zakwaszając do wartości pH około 6. Wydajność wynosi ponad 60% wydajności teoretycznej, a czystość otrzymanego enzymu, mierzona za pomocą pomiaru absorpcji światła przy długości fali 280 milimikronów, wzrasta 20-krotnie.

h) 100 ml roztworu, otrzymanego w sposób, opisany w przykładzie II c, odsala się częściowo przez dializę destylowaną wodą w ciągu 1 godziny i następnie traktuje karboksymetylocelulozą typu H⁺, w ilości około 40 mg/ml, nastawiając wartość pH na 4,0—4,5. Oddziela się wymienniacz jonowy i eluuje zaabsorbowaną acylazę zwiększając wartość pH do około 6 i dodając fosforanowego roztworu buforowego w celu zwiększenia stężenia jonów.

i) Postępując w sposób, opisany w przykładzie VI h, przerabia się jako materiał wyjściowy roztwór otrzymany w sposób opisany w przykładzie II h.

j) 100 ml roztworu otrzymanego w sposób, opisany w przykładzie II c, odsala się i usuwa białko, traktując karboksymetylocelulozą typu H⁺ w ilości około 25 mg/ml, a następnie taką samą ilością dwuetyloaminoetylocelulozy typu OH⁻. Wartość pH mieszaniny nastawia się tak, aby nie przekraczała poza 5—7. Proces ten można powtarzać, ale trzeba go zatrzymać zanim ulegnie absorpcji znaczna ilość acylazy. Enzym adsorbuje się następnie za pomocą karboksymetylocelulozy i eluuje w sposób opisany w przykładzie VI h.

k) 100 ml roztworu, otrzymanego w sposób, podany w przykładzie II c lub II h, traktuje się, jak opisano w przykładzie VII j, ale nie dodaje się dwuetyloaminoetylocelulozy.

Przykład VII. Stężenie i oczyszczanie acylazy metodą ultrafiltracji.

10 ml roztworu, otrzymanego w sposób, podany w przykładzie II c i częściowo odsolonego i pozabawionego białka przez traktowanie wymienniaczem jonowym w sposób, opisany w przykładzie VI j, lecz pomijając fazę adsorbowania za pomocą karboksymetylocelulozy, rozcieńcza się 40 ml destylowanej wody i przesącza pod zwiększonym ciśnieniem przez przeponę zatrzymującą całkowicie cząsteczki o ciężarze cząsteczkowym większym niż 50000. 2 ml koncentratu zawierającego głównie acylazę suszy się przez wymrażanie.

Przykład VIII. Strącanie acylazy za pomocą siarczanu amonowego.

a) Do 1000 ml oczyszczonego roztworu acylazy, otrzymanego w sposób, opisany w przykładzie IV b i mającego aktywność 358 j/ml, dodaje się 570 g siarczanu amonowego i miesza aż do rozpuszczenia się soli. Roztwór pozostawia się na przeciąg 2 godzin w temperaturze 5°C i odsącza wytworzony osad. Otrzymuje się 52,5 wilgotnego produktu o aktywności 5160 j/g.

b) 47,0 g wilgotnego związku, otrzymanego w sposób, opisany w przykładzie VIII a i mającego aktywność 5160 j/g, suszy się w powietrzu w temperaturze 25°C w ciągu nocy. Otrzymuje się 19,85 g produktu o aktywności 7580 j/g.

Przykład IX. Oczyszczanie acylazy metodą dializy. 11 ml roztworu acylazy o aktywności 48 j/ml, otrzymanego w sposób, opisany w przykładzie II c, poddaje się dializie za pomocą dejonizowanej wody w ciągu nocy. Otrzymany roztwór liofilizuje

się w sposób opisany w przykładzie V, otrzymując 0,06 g produktu o aktywności 8000 j/g.

Przykład X. Oczyszczanie acylazy przez filtrację żelową.

150 g roztworu acylazy o aktywności 166 j/g, otrzymanego w sposób, opisany w przykładzie IV b, stęża się przez odparowywanie pod zmniejszonym ciśnieniem do objętości 9 ml, filtruje przez kolumnę 3×80 cm, wypełnioną preparatem Sephadex G 75 i eluuje dejonizowaną wodą. Otrzymuje się 80 ml produktu o aktywności 21200 jednostek, zawierającego 15,2% materiału, zawartego w wyjściowym surowcu, co ustala się na podstawie pomiaru adsorpcji przy długości fali 280 milimikronów.

Przykład XI. Sprzęganie acylazy E. coli z polimerami.

a) Roztwór agarowy (2,5 ml 4% Sepharose 4 B) przesącza się oddzielony wilgotny osad miesza w ciągu 8 minut przy pH=11,5–12,0 z 2 ml 5% roztworu wodnego bromku cyjanu ochłodzonego lodem. Powstały żel odsącza się przemywa na sączku wodą ochłodzoną lodem i następnie ochłodzonym za pomocą lodu 0,1 m roztworem boraksu. Przemyty osad miesza się z 4 ml 0,1 m roztworu boraksu i następnie z 0,106 g acylazy, E. coli o aktywności 159000 j/g, otrzymanej w sposób, opisany w przykładzie VI d. Mieszanie prowadzi się w ciągu 24 godzin w temperaturze 4°C. Powstałą mieszaninę odsącza się, przemywa osad wodą i otrzymuje 1,2 g wilgotnego polimeru o aktywności właściwej 679 j/g.

b) 0,100 g Sephadex G 25 miesza się w ciągu 8 minut przy pH=11,5–12 z 2 ml ochłodzonego lodem 5% roztworu wodnego bromku cyjanu i odsącza. Otrzymany żel przemywa się lodowatą wodą i następnie 4 ml lodowatego 0,1 m roztworu wodnego boraksu. Do tego osadu dodaje się 0,106 g acylazy E. coli o aktywności 159000 j/g, otrzymanej w sposób podany w przykładzie VI d i miesza w temperaturze 4°C w ciągu 24 godzin. Następnie nastawia się wartość pH mieszaniny na 7,5 i odsącza mieszaninę, przemywając osad wodą. Otrzymuje się 0,3 g polimeru o aktywności właściwej 212 j/g.

c) Powtarza się proces, opisany w przykładzie XI b, stosując 0,1 g DEAE — Sephadex A50 zamiast Sephadex G 25. Otrzymuje się 1,25 g wilgotnego polimeru o aktywności właściwej 435 j/g.

d) Powtarza się proces, opisany w przykładzie XI b, stosując 0,1 g sproszkowanej celulozy (Macherey, Nagel and Co, MN — 300). Otrzymuje się 0,35 g polimeru o aktywności właściwej 261 j/g.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania acylazy penicylinowej nie zawierającej komórek bakterii, z hodowli mikroorganizmów Escherichia coli wytwarzających ten enzym, na drodze wydzielania komórek z brzeczki, ekstrakcji enzymu z komórek i wyodrębnienia acylazy penicylinowej, **znamienny tym**, że wydzielone z brzeczki komórki bakterii oddziela się od ciekłej kultury mikroorganizmu z jednoczesnym wytlóceniem materiału, zawierającego komórki, w separatorze odśrodkowym w temperaturze 0–50°C, korzystnie 15–40°C, w czasie 0,05–1,0 sekundy, korzystnie 0,1–0,5 sekundy przez szczelinę na obwodzie o szerokości 0,1–1,5 mm, korzystnie 0,3–0,7 mm pod ciśnieniem 35–140 atm., korzystnie 63–77 atmosfer, po czym przeprowadza się ekstrakcję acylaz penicylinowych z wytlóconego materiału komórkowego, korzystnie w temperaturze 20–40°C przez okres 0,1–5,0 godzin, korzystnie 0,25–1,0 godziny, w mieszalniku z dobrze działającym mieszadłem, po czym do mieszaniny dodaje się ewentualnie nie mieszający się z wodą rozpuszczalnik organiczny w ilości 1–5% i ponownie oczyszcza od pozostałego materiału komórkowego i innych stałych substancji.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że po wymieszaniu wytlóconego materiału komórkowego z wodą, ekstrakt wodny zawierający acylazę penicylinową zakwasza się do pH=3,0–6,0, odsącza materiał komórkowy, a pH przesącza ponownie doprowadza do pierwotnej wartości.