



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

262510

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 P 35/00

(22) Přihlášeno 30 06 87

(21) PV 4909-87.F

(40) Zveřejněno 16 08 88

(45) Vydáno 14 07 89

(75)

Autor vynálezu

PLHÁČKOVÁ KAMILA RNDr., VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc.,
BEČKA STANISLAV RNDr. CSc., PÍSAŘIKOVÁ ALEXANDRA RNDr.,
KRUMPHANZL VLADIMÍR člen korespondent ČSAV, BARTA MIROSLAV RNDr.,
PRAHA, MARTVOŇ AUGUSTIN doc. ing. CSc., BRATISLAVA,
WELWARD LADISLAV ing. CSc., BANSKÁ BYSTRICA

(54) **Způsob selektivního odstraňování esteráz z mikrobiálních buněk s aktivitou hydrolázy 7β-(4-karboxybutanamido) cefalosporánové kyseliny**

Řešení se týká způsobu selektivního odstraňování esteráz z mikrobiálních buněk s aktivitou hydrolázy 7β-(4-karboxybutanamido)cefalosporánové kyseliny spočívající v tom, že buňky se v průběhu nebo po ukončené submersní kultivaci buď přímo ve fermentační kapalině, nebo po oddělení buněk z fermentační kapaliny, uvedou ve styk s alkalickým prostředím v rozmezí hodnot pH 8,5 až 12,0. Ošetřené buňky se po separaci dále dezintegrují a v získaném homogenátu se odstraní zbylá frakce esteráz kombinací přísadky flokulatu, změny teploty a hodnot pH, načež se sraženina odstraní separací, čímž se získá roztok obsahující vysokou aktivitu uvedeného enzymu bez nežádoucích enzymových aktivit.

Vynález se týká způsobu selektivního odstraňování esteráz z mikrobiálních buněk s aktivitou hydrolázy 7-beta-(4-karboxybutanamido)cefalosporánové kyseliny.

Enzym hydroláza 7-beta-(4-karboxybutanamido)cefalosporánové kyseliny (dále jen hydroláza glutaryl-7-ACK) katalyzuje hydrolýzu 7-acylaminocefemsloučenin na 7-aminocefemsloučeniny, zejména 7-beta-(4-karboxybutanamido)cefalosporánovou kyselinu (dále jen glutaryl-7-ACK) na 7-aminocefalosporánovou kyselinu (dále jen 7-ACK). 7-ACK slouží jako farmaceuticky významný meziprodukt pro výrobu polosyntetických cefalosporinů, zejména cefalotinu a cefazolinu.

Dosud popsané kmeny mikroorganismů, které jsou schopny syntetizovat požadovaný enzym, hydrolázu glutaryl-7-ACK, rovněž syntetizují další enzymy, které z hlediska přípravy 7-ACK nejsou žádoucí, neboť atakují 7-acylaminocefemsloučeniny jiným a nežádoucím způsobem. Jde zejména o beta-laktamázy a esterázy.

Je známo, že esterázy (hydrolázy karboxylových esterů) tvoří velice komplexní skupinu enzymů a jsou produkovány v buňkách rostlinných, živočišných i buňkách mikroorganismů. Některé z podskupin, např. karboxyesterázy, arylesterázy a acetyesterázy mají poměrně širokou substrátovou specifitu a mohou hydrolyzovat též řadu esterů octové kyseliny. Je známo, že tyto esterázy jsou velmi rozšířeny u mikroorganismů nejrůznějších rodů, zejména u rodu *Pseudomonas*, přičemž jeden kmen může produkovat i několik typů těchto enzymů (Rodler a sp., *Acta microbiol. Acad. Sci., Hung.* 20, 577, 1973; Reddy a sp., *Appl. Microbiol.* 20, 555, 1970). Široká specifita účinku esteráz dovoluje, jak je známo, katalýzu deacetylace 3-acetoxymetyl-cefemsloučenin (jako je např. cefalosporin C, glutaryl-7ACK a 7-ACK) na jejich deacetylované deriváty, tj. odpovídající 3-hydroxymetyl-cefemsloučeniny. Vysoce nespecifické intracelulární esterázy různých mikroorganismů jsou též využívány pro záměrnou přípravu deacetylovaných derivátů těchto sloučenin (Abbot a Fukuda, *Antimicrob. Agent. Chemother.* 8, 282, 1985; Konečný, *Enzym. Eng.* 4, 253, 1978).

Pro přípravu 7-ACK jsou tyto esterázy nežádoucí, vzhledem k tvorbě deacetyl-7-ACK (3-hydroxymetyl-7-amino-cefem-4-karboxylová kyselina) a z ní často vznikajícího laktonu tvorbou cyklu mezi hydroxylovou skupinou v poloze 3 a karboxylovou skupinou v poloze 4. Obě tyto sloučeniny znečišťují výsledný produkt (7-ACK) a obtížně se odstraňují při jeho izolaci.

Pro hydrolýzu glutaryl-7-ACK je využíváno buněk z rodu *Pseudomonas* či *Comamonas* (Japonské patentové spisy č. 75 101 584 a č. 7 670 884) dále buněk z rodů *Bacillus*, *Arthrobacter* a *Alcaligenes* (Japonské patentové spisy č. 77 128 293 a č. 7 886 094). V čs. autorských osvědčeních č. 239 293 a č. 260 068 jsou uvedeny produkční kmeny *Pseudomonas* sp. CCM 3 635 a CCM 3 987 využitelné pro enzymovou přípravu 7-ACK.

Citované produkční mikroorganismy ať již samotné, nebo v imobilizované formě, vykazují nežádoucí esterázové aktivity, a jejich využití má za následek výše uvedené komplikace.

Z naznačených důvodů je výhodnější použití izolované technické hydrolázy glutaryl-7-ACK, kde postupem izolace a čištění v jednotlivých stupních lze odstranit nežádoucí esterázy, popř. další, s přípravou 7-ACK interferující enzymy.

Pro izolaci hydrolázy glutaryl-7-ACK lze využít obvyklých separačních postupů pro čištění enzymů nebo postupů popsaného Ichikawou a sp. (*Agric. Biol. Chem.* 45, 2 231, 1981). Tyto čisticí operace jsou však v provozním měřítku technologicky náročné, neboť vyžadují kombinaci iontoměnné a gelové chromatografie, srážení síranem amonným, dialýzu a lyofilizaci.

Postup podle předmětného vynálezu odstraňuje zmíněné nevýhody, neboť jednoduchým selektivním způsobem odstraňuje nežádoucí esterázy z mikrobiálních buněk a umožňuje buď přípravu buněčné biomasy, kde více jak 90 % celkové esterázové aktivity je odstraněno, nebo přípravu technické rozpustné hydrolázy glutaryl-7-ACK, kde jsou nežádoucí esterázové

aktivity odstraněny kvantitativně. Enzymově aktivní biomasa ošetřená postupem podle předmětného vynálezu může sloužit jako výchozí materiál pro imobilizaci buněk postupem podle čs. autorského osvědčení č. 251 111, které je závislé na čs. autorském osvědčení č. 231 458, nebo může sloužit jako výchozí materiál pro další postup podle předmětného vynálezu, podle kterého lze získat technický rozpustný enzym, hydrolázu glutaryl-7-ACK, která neobsahuje nežádoucí esterázové aktivity vůbec, a která může sloužit jako výchozí materiál pro imobilizaci enzymu principiálně postupem podle čs. autorského osvědčení č. 231 656.

Způsob selektivního odstraňování esteráz z mikrobiálních buněk s aktivitou hydrolázy 7-beta-(4-karboxybutanamido)cefalosporánové kyseliny podle předmětného vynálezu spočívá v tom, že se buňky v průběhu nebo po ukončení submersní kultivace ve fermentační kapalině, nebo po jejich oddělení z fermentační kapaliny ve formě buněčné pasty či zahuštěné vodné suspenze, uvedou ve styk s alkalickým prostředím při pH 8,5 až 12,0, s výhodou 10,0 až 11,0, při teplotě 5 až 40 °C, s výhodou 25 až 35 °C za nepřetržitého míchání a/nebo stání, načež se ošetřené buňky separují a po případě promyjí vodou nebo puforem, načež se popřípadě ošetřené buňky desintegrují a k získanému homogennímu homogenátu se přidá flokulant, s výhodou flokulant obsahující frakci polyetyleniminu, v rozmezí koncentrací 0,05 až 10 % objem/objem, při pH 4,4 až 7,0, homogenát se zahřeje na 30 až 50 °C, sraženina se separuje a v získané supernatantní kapalině se po případě znovu upraví pH v rozmezí hodnot 4,0 až 5,5, s výhodou 4,5 až 4,7, a vzniklá voluminózní sraženina se opět separuje.

Uvedeným postupem se získá buď enzymově aktivní biomasa, která vykazuje přibližně stejnou nebo zvýšenou specifickou aktivitu hydrolázy glutaryl-7-ACK a minimální specifickou esterázovou aktivitou ve srovnání s intaktní kulturou buněk. Lze předpokládat, že zvýšení specifické aktivity hydrolázy glutaryl-7-ACK může být způsobeno snížením permeabilitní bariéry buněk a že ztráta esterázové aktivity je způsobena uvolněním esteráz z buněk v souvislosti se změnami povrchových struktur buňky a popřípadě nevratnou denaturací esterázových aktivit. Uvedeným postupem lze dále získat roztok bílkovin s obohacenou frakcí hydrolázy glutaryl-7-ACK bez esterázové aktivity.

Z uvedeného je zřejmé použití získaných materiálů pro ekvivalentní imobilizační postupy zmíněné v popisu vynálezu. V druhém případě lze vodný roztok obsahující rozpustnou frakci hydrolázy glutaryl-7-ACK dále obohacovat známými postupy, výhodně srážením organickými rozpouštědly. Vodný roztok technického enzymu lze rovněž zahustit za vakua a uchovávat ve zmrzlém stavu nebo lyofilizovat.

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-dimetylamino-benzaldehydu, který reaguje se 7-ACK za vzniku barevné Schiffovy baze podle čs. patentového spisu č. 111 959, v modifikaci podle Balasinghama a sp. (Biochim. Biophys. Acta, 276, 250, 1972). Jedna jednotka enzymové účinnosti (U) je takové množství enzymu, které odpovídá tvorbě jednoho μ molu 7-ACK za minutu za výše uvedených podmínek reakce. 7-ACK byla sledována dále chromatograficky za použití tenké vrstvy celulózy v systému n-propanol-voda (7:3) s ninhydrinovou detekcí (R_f 0,5).

Vzhledem k možnosti existence několika druhů esteráz hydrolyzujících estery octové kyseliny, z nichž buď všechny nebo několik se může uplatňovat při deacetylaci glutaryl-7-ACK a 7-ACK, byla aktivita esteráz zjišťována metodou pro stanovení nespecifických esteráz na základě měření rychlosti hydrolýzy alfa-naftylacetátu (alfa-naftylester kyseliny octové) na alfa-naftol v 0,1 M tris-HCl pufru o pH 7,5 při teplotě 37 °C v oblasti enzymové kinetiky nultého řádu. Alfa-naftol byl stanoven spektrofotometricky po reakci s diazoniovou solí o-dianisidinu (Fast Blue B sul) a výtěpu barevné sloučeniny do etylacetátu. Měření bylo prováděno při 520 nm (Seligman a Nachlas, J. Clin. Invest. 29, 31, 1950). Jednotka esterázové aktivity (U) je takové množství enzymu, které katalyzuje vznik jednoho μ molu alfa-naftolu za minutu za výše uvedených podmínek reakce.

Specifické aktivity esteráz a hydrolázy glutaryl-7-ACK jsou definovány jako U.g^{-1} suché hmoty buněk nebo U.g^{-1} bílkovin. Koncentrace bílkovin v roztoku enzymu byla sledována podle Lowry a sp. (J. Biol. Chem. 193, 265, 1951).

Pro selektivní odstraňování esteráz podle předemného postupu bylo použito produkčních mikrobiálních kmenů z rodu *Pseudomonas*, které byly získány podle čs. autorských osvědčení č. 239 293 a č. 260 068 a způsobu submersní kultivace těchto kmenů podle čs. autorského osvědčení č. 262 502.

Postup je dále doložen v příkladech provedení aniž by se omezoval na mikrobiální producenty hydrolázy glutaryl-7-ACK a způsoby jejich submersní kultivace.

Příklady provedení

P ř í k l a d 1

50 g vlhké separované buněčné pasty *Pseudomonas* sp. CCM 3 987 po ukončené kultivaci bylo suspendováno v o bjemu 1 litr 0,05 M Na-bikarbonátového pufru o pH 10,7 a směs byla míchána 3 hodiny při 30 °C. Poté byly buňky separovány centrifugací (10 000 g/20 minut) a promyty 0,1 M fosfátovým pufrům o pH 7,0.

Ošetřená buněčná pasta vykazovala ve srovnání s intaktními buňkami před ošetřením 95 % specifické aktivity hydrolázy glutaryl-7-ACK a 10 % původní specifické aktivity esteráz.

P ř í k l a d 2

Byla provedena submersní kultivace kmene *Pseudomonas* sp. CCM 3 987 ve fermentačním tanku způsobem popsaným v čs. autorském osvědčení č. 262 502. Po 30 hodinách submersní kultivace byl za míchání, vzdušnění a potenciometrické kontroly pH postupně ze zásobníku vnášen do vyrostlé kultury sterilní roztok čpavkové vody ředěný destilovanou vodou 1:1 dokud pH nedosáhlo hodnoty 10,7. Poté byla kultura míchána a vzdušněna za těchto podmínek po dobu 18 h a buňky byly separovány na odstředivce Sharples do formy buněčné pasty.

Specifická aktivita hydrolázy glutaryl-7-ACK buněk byla 60 U.g^{-1} suché hmoty a aktivita nespecifických esteráz byla $2,6 \text{ U.g}^{-1}$ suché hmoty, což je 130 % aktivity hydrolázy glutaryl-7-ACK a 1,5 % aktivity esteráz ve srovnání s intaktními buňkami ve 30. h kultivace.

P ř í k l a d 3

Submersní kultivace kmene *Pseudomonas* ps. CCM 3 987 byla provedena stejným způsobem jako v příkladu 2 s tím rozdílem, že úprava pH kultury čpavkovou vodou na hodnotu pH 10,7 byla provedena ve 48. h kultivační a kultura byla míchána a vzdušněna za stejných podmínek, avšak pouze po dobu 3 h.

Buňky byly separovány odstředěním a specifická aktivita hydrolázy glutaryl-7-ACK buněk byla 75 U.g^{-1} suché hmoty a aktivita esteráz 8 U.g^{-1} suché hmoty, což je 150 % aktivity hydrolázy glutaryl-7-ACK a 5,5 % aktivity esteráz ve srovnání s aktivitou intaktních buněk ve 48. h kultivace.

P ř í k l a d 4

Submersní kultivace stejného kmene mikroorganismu a ošetření buněk bylo provedeno stejným způsobem jako v příkladu 3 s tím rozdílem, že úprava pH kultury ve 48. h kultivace na hodnotu 10,7 byla provedena pomalým dávkováním 20% roztoku hydroxidu sodného.

Specifická aktivita hydrolázy glutaryl-7-ACK byla $54,6 \text{ U.g}^{-1}$ suché hmoty buněk a aktivita esteráz $12,9 \text{ U.g}^{-1}$ suché hmoty, což je 109,2 aktivity hydrolázy glutaryl-7-ACK a 8,9 % aktivity esteráz ve srovnání s intaktními buňkami ve 48. h kultivace.

P ř í k l a d 5

Submersní kultivace kmene *Pseudomonas* sp. CCM 3 635 a ošetření buněk bylo provedeno stejným způsobem jako v příkladu 3 s tím rozdílem, že úprava pH kultury ve 48. h kultivace byla provedena postupným přidáváním pevného uhlíčitanu sodného do hodnoty pH kultury 10,2.

Specifická aktivita hydrolázy glutaryl-7-ACK byla 20 U.g^{-1} suché hmoty buněk a specifická aktivita esteráz $9,5 \text{ U.g}^{-1}$ suché hmoty buněk, což je 118,8 % aktivity hydrolázy glutaryl-7-ACK a 6,6 % aktivity esteráz ve srovnání s intaktními buňkami ve 48. h kultivace.

P ř í k l a d 6

Byla provedena submersní kultivace a ošetření buněk *Pseudomonas* sp. CCM 3 987 při pH 10,7 stejným způsobem jako v příkladu 3.

600 g vlhké hmoty (pasty) buněk získaných odstředěním na separátoru Sharples bylo suspendováno v 0,02 M fosfátovém pufru o pH 7,0 na celkový objem 2 litry. Směs byla vychlazená na teplotu 5°C a provedena desintegrace buněk čtyřnásobným průchodem štěrbínovým mechanickým desintegrátorem Manton-Gaulin (15 M - STA, USA) za tlaku 400 MPa. Mezi jednotlivými cykly byla suspenze chlazená na teplotu 5°C a mikroskopicky sledován stupeň desintegrace buněk.

Za míchání a potenciometrické kontroly pH byla postupně přidávána k popsáným způsobem získané desintegrované suspenzi buněk 2,0 M roztok kyseliny octové a hodnota pH nastavena na 6,2, načež byl po částech přidáván vodný roztok flokulantu (Sedipur-CL-930, BASF, NSR) do jeho výsledné koncentrace v suspenzi 0,2 %. Poté byla směs vytemperována na 40°C a ponechána při této teplotě za občasných promíchání 30 minut. Po této době byl buněčný detrit odstředěn při 10 000 g. Získaný supernatant byl vychlazen na teplotu 5°C a pH nastaveno na hodnotu 4,6 postupným přidáváním 2,0 M kyseliny octové za nepřetržitého míchání. Po 15 minutách míchání byla voluminózní sraženina odstředěna (16 000 g) a pH získané supernatantní kapaliny bylo upraveno na hodnotu 7,0 postupným přidáváním 1,0 M roztoku hydroxidu sodného v průběhu nepřetržitého míchání.

Získaný roztok (1,2 litru) byl prostý aktivity nespecifických esteráz a obsahoval 1 380 U hydrolázy glutaryl-7-ACK a 3,5 g bílkovin v litru. Specifická aktivita hydrolázy glutaryl-7-ACK byla 394 U.g^{-1} bílkovin. Celkový výtěžek enzymu hydrolázy glutaryl-7-ACK z buněčné suspenze byl 30 %.

P Ř E D M Ě T V Ý N Á L E Z U

Způsob selektivního odstraňování esteráz z mikrobiálních buněk s aktivitou hydrolázy 7-beta-(4-karboxybutanamido)cefalosporánové kyseliny, vyznačující se tím, že se buňky v průběhu nebo po ukončení submersní kultivace ve fermentační kapalině, nebo po jejich oddělení z fermentační kapaliny ve formě buněčné pasty či zahuštěné vodné suspenze, uvedou ve styk s alkalickým prostředím při pH 8,5 až 12,0 s výhodou 10,0 až 11,0, při teplotě 5 až 40°C s výhodou 25 až 35°C za nepřetržitého míchání a/nebo stání, načež se ošetřené buňky separují a popřípadě promyjí vodou nebo pufrem, načež se popřípadě ošetřené buňky desintegrují a k získanému homogenátu se přidá flokulant, s výhodou flokulant obsahující frakci polyetyleniminu, v rozmezí koncentrací 0,01 až 10,0 % objem/objem, při pH 4,4 až 7,0, homogenát se zahřeje na 30 až 50°C , sraženina se separuje a v získané supernatantní kapalině se popřípadě znovu upraví pH v rozmezí hodnot 4,0 až 5,5, s výhodou 4,5 až 4,7 a vzniklá voluminózní sraženina se opět separuje.