

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET  
KØBENHAVN

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 153502 B



(21) Patentansøgning nr.: 6835/74

(22) Indleveringsdag: 27 dec 1974

(41) Alm. tilgængelig: 29 jun 1975

(44) Fremlagt: 18 jul 1988

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 28 dec 1973 GB 59978/73

(51) Int.Cl.<sup>4</sup>

C 12 P 37/06

C 12 N 11/08

(71) Ansøger: \*BEECHAM GROUP LIMITED; Beecham House; Great West Road; Brentford; Middlesex, GB

(72) Opfinder: Thomas Adrian \*Savidge; GB, Lawson William \*Powell; GB

(74) Fuldmægtig: Plougmann & Vingtoft Patentbureau

(54) Vanduopløseligt enzymcomplex omfattende et penicillinacylaseenzym og fremgangsmåde til fremstilling af 6-aminopenicillansyre under anvendelse af et sådant enzymcomplex

(56) Fremdragne publikationer

DK 153502 B

Den foreliggende opfindelse angår i forhold til teknikkens standpunkt forbedrede enzymcomplexer, især sådanne, som fremstilles ud fra acylaseenzymer, der vides at spalte penicilliners amidbinding, samt en fremgangsmåde til fremstilling af 6-aminopenicillansyre, som i det 5 følgende betegnes "6-APA", under anvendelse af sådanne enzymcomplexer. Acylaseenzymer, der vides at spalte penicilliners amidbinding, betegnes her "penicillinacylaser", og de kan anvendes til fremstilling af 6-aminopenicillansyre ud fra penicilliner, der er vundet ved fermentationsprocesser med naturligt forekommende materialer, 10 idet enzymet anvendes under sådanne pH-betingelser, at der sker deacylering af penicillinen (eller spaltningen af amidgruppen) under dannelse af den ønskede 6-aminopenicillansyre.

Selv om sådanne penicillinacylase-(eller deacylase)-enzymer i enten cellebunden eller cellefri tilstand er blevet anvendt til det oven- 15 nævnte formål siden ca. 1961, er anvendelsen forbundet med vanskeligheder, når det cellefrie enzym anvendes, da dette ikke let skilles fra reaktionsblandingen; desuden gælder, at det cellebundne enzym ikke er let at genanvende. Hertil kommer, at begge typer enzym producerer 6-APA, som er forurennet med spormængder af bakterielt 20 protein. Det er i britisk patentskrift nr. 1.193.918 foreslået af overvinde disse vanskeligheder ved at binde enzymet til et polymer-substrat og derved gøre det vandopløseligt. Sådanne polymer-enzym-complexer har imidlertid vist sig at have ringe mekanisk stabilitet, når de polymere, der anvendes som substrat, er sådanne, som er 25 almindeligt kommercielt tilgængelige til andre formål. De polymere må derfor tilpasses og fremstilles specielt til formålet, og dette er kostbart. Når 6-APA fremstilles under indvirkning af acylaseenzymer, er det endvidere nødvendigt at regulere reaktionsblandingsens pH-værdi inden for et snævert område under hele reaktionen, og dette kræver 30 kontinuerlig tilsætning af et alkali til neutralisering af den carboxylsyre, som dannes ud fra den frigjorte penicillinsidekæde. Det har vist sig, at når acylaseenzymet er direkte bundet med en covalent binding til et polymersubstrat, må man være omhyggelig med valget af det alkali, der skal anvendes til denne neutralisation, og at det 35 sædvanligvis foretrukne alkali, natriumhydroxid, ikke kan anvendes uden at enzymet denatureres hurtigt. Hvis man som følge heraf ønsker

at anvende en flygtig base, f.eks. ammoniak eller triethylamin, kan det være nødvendigt at foretage en kostbar modifikation af det anlæg, som i forvejen anvendes til fremstilling af 6-APA ved hjælp af acylaseenzymet i dets cellebundne form, eftersom der med det  
5 cellebundne enzym ikke er nogen vanskeligheder ved anvendelse af natriumhydroxid til neutralisation af den frigjorte sidekæde-syre.

Det er også blevet foreslået i tysk offentliggørelsesskrift nr. 2.143.062 at fremstille et vandopløseligt penicillinacylasepræparat ved at adsorbere acylasen på et substrat og dér tværbinde den ved  
10 indvirkning af et vandopløseligt dialdehyd med og uden dannelse af bindinger mellem polymersubstratet og enzymet. Ved denne metode bliver enzymet overvejende tværbundet omkring substratet og er ikke bundet dertil med covalente bindinger. I den nævnte publikation beskrives forskellige substrater, f.eks. anionbytterharpikser, dvs.  
15 sådanne, som indeholder basiske grupper såsom primære, sekundære eller tertiære aminogrupeer eller lignende nitrogenholdige funktionelle grupper, eller carboxymethylcellulose, eller polymere med neutral reaktion, f.eks. fordi de tilstedeværende funktionelle grupper er estergrupper.

20 Det har vist sig, at substrater med negativt ladede funktionelle grupper er bedre end substrater med positivt ladede funktionelle grupper. Der er f.eks. udført to forsøg til sammenligning af cellulose med på den ene side positivt og på den anden side negativt ladede grupper, nemlig diethylaminoethylcellulose (DEAE-cellulose) og  
25 carboxymethylcellulose (CM-cellulose). Betingelserne for koblingen af penicillinacylase til hvert substrat blev optimeret, og samme enzymopløsning blev anvendt til kobling til hver bærer under anvendelse af disse optimale betingelser. Aktiviteten af det færdige immobiliserede enzympræparat udgjorde for henholdsvis DEAE- og CM-  
30 cellulose henholdsvis 11% og 42% af den oprindelige totale aktivitet af enzymopløsningen. DEAE-cellulosepræparaternes lavere aktivitet skyldtes dårlig adsorption af enzymet. Når forsøget blev gentaget under anvendelse af en anden enzymopløsning, var resultaterne 24% og 56% for henholdsvis DEAE- og CM-cellulose. Enzymcomplexer fremstillet  
35 ud fra celluloser har imidlertid dårlig mekanisk stabilitet, således som det er beskrevet af D.L. Regan, P. Dunnill og M.D. Lilly

"Immobilized Enzyme Reaction Stability: Attrition of the Support Material" i Biotechnology and Bioengineering: Vol. XVI, side 333-343 (1974).

Endvidere gælder, at de complexer, som er fremstillet ved adsorptions-tværbindings-teknikken, hvor substratet er en polymer med neutral aktivitet, har reaktivitets- og genanvendeligheds-egenskaber, som også kan betragtes som utilfredsstillende. Således er f.eks. stabiliteten af penicillinacylase adsorberet og tværbundet på det neutrale substrat "Amberlite" XAD-7 ("Amberlite" er et varemærke), bestemt ved opbevaring af det immobiliserede enzympræparat ved en temperatur på 37°C, utilfredsstillende, da aktiviteten efter 14 dages opbevaring er faldet med 66%.

Det har vist sig, at hvis den i det ovennævnte offentliggørelses-skrift beskrevne teknik anvendes i forbindelse med homopolymere eller copolymere af methacrylsyre, dvs. polymere med en carboxylsyrefunktion af den aliphatiske type, er de resulterende enzymcomplexer overraskende overlegne derved, at de har en høj enzymaktivitet, som bibeholdes efter gentagne anvendelser til fremstilling af 6-APA. Substrater bestående af makroporøse eller af geltypen værende polymere af styren, acrylsyre eller phenol-formaldehyd med enten sulfonsyre-, phosphorsyre- eller carboxylsyrefunktionelle grupper har vist sig at være udpræget underlegne i forhold til makroporøse og gelpolymere og -copolymere af methacrylsyre. Disse præparaters særdeles gode stabilitet kan også vises ved resultater efter opbevaring ved 37°C. Ved et sådant forsøg konstateredes det, at aktiviteten af et immobiliseret enzympræparat, som var fremstillet ved at adsorbere og tværbinde acylase på en makroporøs polymer af methacrylsyre, som forhandles under varemærket "Amberlite" IRC-50, kun reduceredes med 5% i forhold til den oprindelige aktivitet efter 14 dages opbevaring ved 37°C.

Disse enzymcomplexer har også forbedret mekanisk stabilitet. Den mekaniske stabilitet er vigtig ved anvendelsen af en hvilken som helst reaktionsbeholder med omrøring, da det er nødvendigt at omrøre reaktionsblandingen meget kraftigt for at opretholde en ensartet pH-værdi og nedsætte alkali-nedbrydning af penicillin til det mindst

mulige. I de forbedrede reaktorsystemer, som nu er under udvikling, f.eks. hvor det uopløselige enzymcomplex tilbageholdes i reaktoren ved hjælp af en sigte med egnet maskestørrelse, og hvor reaktionsmediet lades løbe af efter afslutningen af en reaktion til fremstilling af 6-APA, forbliver det uopløselige enzympræparat i reaktoren og er klar til genanvendelse. På denne måde nedsættes de fysiske tab af enzym, som normalt forekommer, når hele blandingen fjernes fra beholderen, og det uopløselige enzympræparat genvindes ved filtrering eller centrifugering og tilbageføres til reaktionsbeholderen. Desuden undgås mikrobiel forurening af enzympræparatet under manipulering. Det er imidlertid vigtigt, at enzymcomplexet ikke nedbrydes mekanisk, således at der sker væsentlige tab som følge af, at det passerer gennem den tilbageholdende sigte. Endvidere gælder, som det er vist af Regan, Dunnill og Lilly (loc. cit.), at de små partikler, som hidrører fra nedslidning af aminoethylcellulose, hvortil der er bundet  $\beta$ -galactosidase, har højere specifikke aktiviteter end de større partikler, og tabet af sådanne partikler fra reaktoren vil derfor sandsynligvis føre til et tab af total aktivitet, som er helt ude af forhold med vægten af det tabte materiale.

I et andet reaktorsystem, som er beskrevet i beskrivelsen til belgisk patent nr. 782,646, tilbageholdes det uopløselige enzympræparat i en søjlereaktor, hvorigennem substrat cirkuleres med en hurtig strømningshastighed, således at de nødvendige pH-justeringer kan udføres i en beholder, som er adskilt fra det uopløselige enzympræparat. Substratet må derfor have sådanne hydrauliske egenskaber, at det ikke nedbrydes mekanisk af de høje tryk, som kræves til opretholdelse af den hurtige strømning af reaktionsblandingen. Hvert af disse reaktorsystemer kan modificeres således, at de virker som kontinuerlige reaktorsystemer, og problemerne med tilstrækkelig mekanisk stabilitet sammen med enzymreaktivitet og genanvendelighed vil stadig bestå.

En yderligere fordel ved at anvende homopolymere og copolymere af methacrylsyre er, at disse harpikser i sig selv har god mekanisk stabilitet. Desuden gælder, at når enzymcomplexer fremstillet ud fra disse harpikser har undergået aktivitetstab til et uacceptabelt niveau efter gentagen genanvendelse i en reaktor, kan harpiksen

regenereres ved fjernelse af det tilbageværende enzym ved behandling med varm alkali. Frisk enzym kan derefter knyttes til den samme harpiks.

Det har også vist sig, at når enzymcomplexerne fremstilles ved adsorption på de ovennævnte methacrylsyrepolymere og -copolymere med efterfølgende tværbinding med bestemte tværbindingmidler, kan det resulterende vandopløselige enzymcomplex anvendes til fremstilling af 6-APA, uden at det er nødvendigt at være særlig forsigtig i valget af det alkali, som kræves til neutralisering af den frigjorte sidekæde-syre. Det har således vist sig, at til forskel fra de systemer, hvor enzymet er bundet direkte til et polymersubstrat med covalente bindinger, kan der anvendes natriumhydroxid til dette formål, således som det for tiden er almindeligt ved anvendelsen af de cellebundne systemer. Hermed undgås sådanne modifikationer af de eksisterende anlægs afdampere, som ville være nødvendige, hvis der til neutralisationen skulle anvendes flygtige alkalier, f.eks. ammoniak eller triethylamin.

I USA patentskrift nr. 3.705.084 beskrives adsorptionen af enzymer på polymere overflader og deres efterfølgende tværbinding. Polymere og copolymere af methacrylsyre angives at være egnede til fremstilling af sådanne polymere overflader. Patentskriftet angiver imidlertid, at de polymere overflader skal have adsorptionsfremmende grupper, som er nitrilgrupper ( $\equiv\text{N}$ ), syreamidgrupper ( $-\text{CONH}_2$ ) eller ureidogrupper ( $-\text{NHCONH}_2$ ), og før polymere og copolymere af methacrylsyre kan anvendes i henhold til dette patentskrifts lære, må man derfor omdanne carboxylgrupper på den polymere og copolymere til en af disse angivne adsorptionsfremmende grupper. De polymere og copolymere af methacrylsyre, som anvendes i henhold til dette patentskrift, adskiller sig derfor fra dem, der anvendes i henhold til den foreliggende opfindelse, ved tilstedeværelsen af disse specifikke adsorptionsfremmende grupper. Ved at angive tilstedeværelsen af disse specifikke adsorptionsfremmende grupper antyder dette patentskrift endvidere, at modificerede polymere og copolymere af methacrylsyre danner bedre enzymcomplexer end de umodificerede polymere og copolymere. Patentskriftet leder derfor bort fra den til grund for den foreliggende opfindelse liggende erkendelse, nemlig at

det, når der er tale om acylaseenzymer, er de umodificerede polymere og copolymere af methacrylsyre, som må foretrækkes.

Til påvisning af overlegenheden af homopolymere og copolymere af methacrylsyre i acylaseenzymcomplexer er der fremstillet acylase-  
5 complexer ud fra nylon og polyurethan, to polymere, som er repræsentative for de foretrukne og eksemplificerede polymere fra USA patentskriftet, under anvendelse af glutaraldehyd som tværbindingssmiddel, og deres aktivitet er blevet sammenlignet med et acylaseenzymcomplex fremstillet ud fra "Amberlite" IRC 50 på lignende måde.  
10 Når der toges hensyn til enzymcomplexernes afvigende partikelstørrelse, viste det sig, at "Amberlite" IRC-50-complexet var 2-3 gange mere aktivt end polyurethancomplexet og så meget som 11 gange mere aktivt end nyloncomplexet. Disse resultater beskrives mere detaljeret i de følgende udførelseseksempler.

15 Ideen med at adsorbere et enzym på et substrat og tværbinde det in situ er også beskrevet i britisk patentskrift nr. 1.257.263. Dette patentskrift omtaler imidlertid ikke penicillinacylaseenzymer, og det beskriver heller ikke anvendelsen af methacrylsyrepolymerer og -  
20 copolymerer som substrater, ligesom det heller ikke nævner de fordele, som opnås ved at vælge substrater med god mekanisk stabilitet. Alligevel udvider det ideen med at tværbinde enzymet omkring substratet ved at anbefale anvendelsen af andre polyfunktionelle reagenser end vandopløselige dialdehyder, f.eks. anvendelsen af bis-diazo-o-dianisidin. På tilsvarende måde antages det, at der til den  
25 foreliggende opfindelses formål foruden glutaraldehyd også kan anvendes f.eks. glyoxal og formaldehyd som tværbindingssmidler.

Et aspekt af den foreliggende opfindelse angår således et vandopløseligt enzymcomplex, som omfatter et penicillinacylaseenzym adsorberet på et vandopløseligt polymersubstrat og tværbundet med et  
30 tværbindingssmiddel, som er glutaraldehyd, glyoxal eller formaldehyd, hvilket enzymcomplex er ejendommeligt ved, at polymersubstratet er en vandopløselig eventuelt tværbundet homopolymer eller copolymer af methacrylsyre.

Et andet aspekt af den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af 6-aminopenicillansyre, ved hvilken benzylpenicillin eller phenoxymethylpenicillin eller et salt deraf i vandig opløsning, som holdes ved en pH-værdi fra 6,0 til 9,0, behandles med et vanduopløseligt enzymcomplex, hvilket enzymcomplex omfatter et penicillinacylaseenzym adsorberet på et vanduopløseligt polymersubstrat og tværbundet med et tværbindingsmiddel, som er glutaraldehyd, glyoxal eller formaldehyd, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at polymersubstratet er en vanduopløselig eventuelt tværbundet homopolymer eller copolymer af methacrylsyre.

Acylaseenzymet til det foreliggende formål fås fortrinsvis ud fra bakterier, f.eks. stammer af *Escherichia coli*, når det skal anvendes til fremstilling af 6-APA ud fra benzylpenicillin, eller f.eks. ud fra fungi og actinomycetes, når der som udgangsmateriale anvendes phenoxymethylpenicillin.

Deacylaseenzymets enzymatiske virkning bestemmes bekvemt i relation til dets evne til at producere 6-APA ud fra benzylpenicillin. Aktiviteten for deacylaseenzymet angives derfor her som den mængde 6-APA (angivet i mikromol,  $\mu\text{M}$ ), som produceres ud fra en opløsning af benzylpenicillin ved pH-værdi 7,8 og  $37^\circ\text{C}$  pr. minut og pr. mg proteinindhold af enzymet, hvilket proteinindhold bestemmes efter standardmetoden i henhold til Lowry. Den enzymatiske aktivitet af de her omhandlede enzymcomplexer bestemmes ligeledes på basis af den mængde 6-APA ( $i\mu\text{M}$ ) som produceres ud fra benzylpenicillin ved pH-værdi 7,8 og  $37^\circ\text{C}$  pr. minut, men på basis af enzymcomplexet i gram.

Det har vist sig, at både adsorptions-tværbindings-reaktionens effektivitet og det dannede vanduopløselige enzymcomplex's specifikke aktivitet forbedres, når renheden af det oprindeligt anvendte enzym forøges. Ud over en vis renhed er der imidlertid et kendeligt fald i de forbedringer, som opnås med en given forøgelse i renhed, og der er således en økonomisk grænse for den ønskelige renhed af enzymet. Deacylaseenzymets renhed ligger således sædvanligvis i området mellem 0,15 og 50  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  proteinindhold og ligger hensigtsmæssigt i området 1,5-30 mikromol/min/mg protein.



Det kan således være ønskeligt at forbedre enzymets renhed, før man foretager adsorption og tværbinding. Dette kan opnås ved at opvarme enzymopløsningen ved ca. 50°C i et kort tidsrum, f.eks. 30 minutter, og/eller ved ultrafiltrering. Andre konventionelle metoder til en-

5 zymrensning, f.eks. fraktioneret udfældning eller behandling med ionbyttercelluloser eller "Sephadex", kan også anvendes.

Substratet til den foreliggende opfindelses formål er homopolymere eller copolymere af methacrylsyre. De indeholder derfor frie carb-

10 oxylgrupper, som giver den polymere en sur funktion. Makroporøse polymere og copolymere af methacrylsyre må foretrækkes fremfor gel-

polymere og -copolymere af methacrylsyre, da de makroporøse polymere og copolymere har en bedre kapacitet på grund af deres større til

rådighed stående overfladeareal.

Det er nødvendigt, at de methacrylpolymerer er vandopløselige, og de

15 er derfor sædvanligvis i form af tværbundne copolymere, f.eks. copolymere af methacrylsyre med divinylbenzen eller en diester af en glycol med methacrylsyre, f.eks. ved anvendelse af ethylenglycol-bis-

methacrylat. Copolymere af methacrylsyre og divinylbenzen har den fordel, at de udviser større mekanisk stabilitet. Andre co-monomere,

20 f.eks. methacrylatestere, kan også have været anvendt ved fremstillingen af copolymere til den foreliggende opfindelses formål. Det kan være fordelagtigt, at den polymere eller copolymere også

indeholder benzensulfonylgrupper, da dette medfører en lille ændring i pH, der kan gøre det muligt at vælge et substrat med optimal pH-

25 værdi. En fordel ved den foreliggende opfindelse er, at den muliggør anvendelsen af polymersubstrater, som allerede er kommercielle produkter til andre formål, især som kationbytterharpikser af svagt sur karakter. Særlig egnet er den methacrylsyre/divinylbenzen-

copolymere, som forhandles under varemærket "Amberlite" IRC-50 af

30 Rohm og Haas Co., USA, og som er en svagt sur, carboxylisk kationbytterharpiks, der kun har neglignelig kapacitet ved pH under 4, og hvis saltform kan regenereres særdeles effektivt med syre, og som har en partikelstørrelse i våd H<sup>+</sup>-form på 16-50 mesh, en initial kvældning (H<sup>+</sup>-form→Na<sup>+</sup>-form) på 100%, en reversibel kvældning

35 (H<sup>+</sup>-form→Na<sup>+</sup>-form) på 70%, en ionbytningskapacitet på 10,0 milliækvivalenter/g (3,5 milliækvivalenter/ml) og en tilsyneladende pKa-værdi

på 5,9, og den methacrylsyre-copolymer, som tidligere forhandlede under navnet "Zeokarb" 227 ("Zeokarb" er et varemærke) af the Permutit Co. Ltd. Den sidstnævnte er en divinylbenzen/methacrylsyre-copolymer, som også indeholder nogle benzensulfonylgrupper.

5 Polymersubstraterne til den foreliggende opfindelses formål er fortrinsvis i form af findelte partikler eller småkugler, med en sådan partikelstørrelse, at de vil passere en 10 A.S.T.M. sigte, dvs. med en partikeldiameter på under 2,0 mm. Det resulterende enzym-complex må imidlertid ikke være så findelt, at det ikke kan adskilles  
10 fra reaktionsblandingen ved en sigtefiltreringsproces eller ved anvendelse i en søjlereaktor. Den polymere bør således have en partikelstørrelse på over 0,01 mm, dvs. at den i det væsentlige bør tilbageholdes på en 800 A.S.T.M. sigte. Det specifikke valg af partikelstørrelse inden for dette område vil afhænge af karakteren af  
15 det reaktorsystem, der skal anvendes.

Det acylaseenzym, som skal bringes i kontakt med den polymere, bør være en vandig opløsning og bør have været dialyseret, indtil dets ionledningsevne er blevet sænket fra den sædvanlige værdi på 5-10 m.mhos til inden for området 0,1-5 m.mhos, fortrinsvis ca. 1 m.mho.  
20 Enzymopløsningens pH-værdi bør hensigtsmæssigt være mellem 4,5 og 7,0, og nogle empiriske eksperimenter kan være nødvendige for at fastslå den optimale pH-værdi inden for dette område, hvis der skal opnås maksimal adsorption og maksimal bibeholdt enzymaktivitet. Denne optimale pH-værdi er imidlertid sædvanligvis mellem 5,2 og 6,5.  
25 Den polymere bør bringes i kontakt med enzymopløsningen i et tilstrækkeligt tidsrum til at sikre maksimal enzymadsorption. Denne opholdstid er sædvanligvis mellem 2 og 16 timer.

Efter sin adsorption på substratet tværbindes enzymet in situ ved behandling med et tværbindingmiddel, som er glutaraldehyd, glyoxal  
30 eller formaldehyd. Det foretrækkes at anvende glutaraldehyd eller glyoxal, og især glutaraldehyd fører til enzymcomplexer med særdeles fordelagtige egenskaber ved anvendelsen til fremstillingen af 6-APA. Tværbindingmidlet anvendes normalt i vandig opløsning i en koncentration mellem 0,1 og 15 vægtprocent, fortrinsvis 0,5-5,0  
35 vægtprocent.

Når tværbindingsreaktionen er tilendebragt, er det ønskeligt at sikre, at eventuelt ikke-omsat tværbindingsmiddel fjernes eller gøres uskadeligt. Man kan f.eks. fjerne et overskud af tværbindingsmidlet ved at vaske med vand eller med en opløsning af en aminforbindelse, og det har vist sig, at urinstof er meget effektivt til dette formål.

Før anvendelsen ved fremstillingen af 6-APA bør enzymcomplexets pH-værdi indstilles omhyggeligt på den værdi, der skal anvendes i produktionsprocessen, sædvanligvis ved tilsætning af alkali ved afslutningen af tværbindingsreaktionen. Denne pH-værdi ligger i området 6,0-9,0, men den er sædvanligvis mellem 7,0 og 8,5, og der foretrækkes en pH-værdi på 7,8. Til denne anvendelse bringes enzymcomplexet ifølge opfindelsen i kontakt med en vandig opløsning af benzylpenicillin eller phenoxymethylpenicillin eller et salt deraf, hvilken opløsning har den ønskede pH-værdi. Reaktionstemperaturen holdes sædvanligvis i området 30-50°C, fortrinsvis 37°C. Under reaktionen frigives phenyleddikesyre fra benzylpenicillin og phenoxyeddikesyre fra phenoxymethylpenicillin, og denne syre neutraliseres kontinuerligt eller med mellemrum for at holde reaktionsblandningens pH-værdi inden for det ønskede område. Som ovenfor nævnt synes valget af alkali til denne neutralisation ikke at være kritisk. Således anvendes særdeles hensigtsmæssigt natriumhydroxidopløsning, men der kan om ønsket anvendes en flygtig aminbase, f.eks. ammoniak eller triethylamin.

De vanduopløselige enzymcomplexer ifølge den foreliggende opfindelse er ofte så stabile, både mekanisk og biologisk, at de kan anvendes til mindst 40 successive spaltninger af penicillin i en charge-reaktor.

Opfindelsen belyses nærmere ved følgende eksempler, i hvilke der anvendes et partielt rensat præparat af acylaseenzym, som er fremstillet ved at frigøre enzymet fra cellerne af en acylaseproducerende stamme af *Escherichia coli* NCLB 8734 mekanisk i en homogenisator.

Cellerester fjernes derefter ved filtrering efter indstilling til pH-værdi 5,0, og enzymopløsningen renses yderligere, om nødvendigt, til

opnåelse af det ønskede område af specifik aktivitet (dvs. 1,5-30 mikromol/min/mg protein). Enzymopløsningen dialyseres derpå, indtil den har en ledningsevne på ca. 1 m.mho.

#### Eksempel 1.

5 Portioner på 20-25 eller 50 g kommercielle kation- og anionbyt-  
terharpikser af den nedenfor angivne art suspenderes i destilleret  
vand (ca. 100-500 ml) og indstilles på pH-værdier mellem 4,4 og 6,3 i  
tilfælde af de kationiske harpikser og på pH-værdier mellem 6,5 og  
9,0 i tilfælde af de anioniske harpikser ved tilsætning af natrium-  
10 hydroxid eller saltsyre under kraftig omrøring. Harpikserne isoleres  
ved filtrering, vaskes godt med destilleret vand og gensuspenderes i  
en opløsning af partielt rensed penicillinacylase (60-100, 250 eller  
500 ml; specifik aktivitet 3,85-6,75  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  protein; ledningsevne  
<1 m.mho) indstilles til den passende pH-værdi. Den mængde enzym, som  
15 harpiksen behandles med, varieres mellem 71 og 308  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  harpiks.  
Enzymet får lov at adsorbere under moderat omrøring i ca. 16 timer,  
idet pH-værdien holdes ved tilsætning af en titrant, hvorefter  
harpiksen isoleres ved filtrering, gensuspenderes i en opløsning af  
glutaraldehyd i vand (100 ml, 0,825%-3,3% w/v) og lades omsætte i ca.  
20 16 timer, idet pH-værdien holdes ved tilsætning af en titrant. De  
resulterende enzym-harpikscomplexer fraskilles, vaskes tre gange med  
destilleret vand, gensuspenderes i vand eller 0,2M phosphatpuffer  
med pH-værdi 7,8 og indstilles på pH-værdi 7,8, behandles i 1 time  
med en vandig opløsning af urinstof (100 ml, 0,1M, pH-værdi 7,8),  
25 hvorpå de til slut vaskes tre gange med destilleret vand.

Hvert på denne måde fremstillet enzymcomplex anvendes til frem-  
stilling af 6-APA ud fra benzylpenicillin under standardbetingelserne  
pH-værdi 7,8 og 37°C. Enzymcomplexernes aktiviteter fremgår af ne-  
denstående tabel I. Aktiviteterne refererer til complexer, som er  
30 fremstillet ved den optimale pH-værdi for enzymadsorption og bibe-  
holdt enzymaktivitet.

Harpikserne "Bio-Rex" og "Chelex" er kommercielle produkter fra Bio-  
Rad Laboratories of California, U.S.A., "Lewatit"-harpikserne er

kommercielle produkter fra Bayer A.G., Forbundsrepublikken Tyskland, og harpikserne "Zeokarb" og "Zerolit" er kommercielle produkter fra the Permutit Co. Ltd, medens "Amberlite"-harpikserne er kommercielle produkter fra Rohm & Haas, Philadelphia, U.S.A. Det vil bemærkes, at  
5 den foreliggende opfindelses fordele er begrænsede til de tilfælde, hvor substratet er en polymer eller copolymer af methacrylsyre.



Tabel I fortsat

p	acrylat-COOH	Amberlite IRC-72	makroporøs	ca. 8,0	ca. 24,0	1
q	acrylat-COOH	Amberlite IRC-84	gel	7,0	13,9	
r	acrylat-COOH	Zerolit 236	gel	ca. 8,0	ca. 17,1	4
s	+ $\frac{2}{\Delta}$ -COOH	Lewatit CNP-80	makroporøs	15,2	36,5	
t	+ $\frac{2}{\Delta}$ -COOH	Lewatit CNP	makroporøs	0	0	
u	phenol-formaldehyd-COOH -OH	Zerolit 216	gel	0	0	
v	methacrylat -COOH $\frac{3}{\Delta}$ -SO <sub>3</sub> H	Zeokarb 227	gel	25,9	57,0	

14

1 Resultaterne meget variable, de angivne værdier er gennemsnit af mange bestemmelser.

2 Polymerstrukturen er ikke kendt.

3 Harpiksen er ikke kommercielt tilgængelig.

4 Mesh størrelse 100 - 200 cf. 14,50 for andre harpikser.

Harpikserne a - c er stærkt anioniske.

Harpikserne d - f er svagt anioniske.

Harpikserne g - l er stærkt kationiske.

Harpikserne o - u er svagt kationiske.

Eksempel 2-5.

Disse eksempler belyser virkningen af variation af acylaseenzymets renhed under adsorptionstrinet. Den anvendte procedure er beskrevet i eksempel 1. Enzymet adsorberes ved pH-værdi 5,7, og enzym-harpiks-  
 5 complexet behandles med 3,3% w/v glutaraldehyd. Den anvendte harpiks er "Amberlite" IRC-50, som er vasket med alkali og derefter med syre. De specifikke aktiviteter af de således fremstillede enzymcomplexer fremgår af nedenstående tabel II. Resultaterne i tabel II viser, at en forøgelse af renheden af det oprindelige enzym inden for dette  
 10 område forøger enzymcomplexets specifikke aktivitet.

Tabel II

Eksempel	Specifik aktivitet af det oprindelige enzym	Enzymaktivitet påført	Specifik aktivitet af enzymharpiks
	$\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ protein	$\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$ harpiks	$\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$ fugtig vægt
2	4,64	216	38,1
3	7,87	463	72,0
4	20,5	1160	124,0
20	18,2	586	109,0

Eksempel 6-15.

Vigtigheden af den pH-værdi, ved hvilken enzymet adsorberes på harpiksen, vises i disse eksempler, hvor:



a) Fem prøver af "Amberlite" IRC-50-harpiks (50 g) indstilles på pH-værdi henholdsvis 4,9, 5,1, 5,3, 5,5 og 5,7, hvorpå de tørres, og derpå sættes hver prøve til en opløsning af partielt rensat penicillinacylase (95 ml; aktivitet 60,9  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ , 16,8 mg protein/ml, ledningsevne 0,55 m.mhos, sat op til et slutrumfang på 200 ml). Efter adsorption i 16 timer ved den pågældende pH-værdi, behandles enzymcomplexet på den i eksempel 1 beskrevne måde, eller

b) fem yderligere prøver af samme harpiks behandles på samme måde med den forskel, at adsorptionsprocessen udføres i pH-værdi-området 5,7-6,5. Det enzym, der anvendes til disse harpikser, har følgende egenskaber (105 ml; aktivitet 54,7  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ ; 9,03 mg protein/ml; ledningsevne 0,75 m.mhos).

Resultaterne af disse forsøg fremgår af nedenstående tabel III. Disse resultater viser, at den optimale pH-værdi for adsorptionstrinet er fra 5,2 til 5,8.

Tabel III

Eksempel	pH-værdi	Specifik aktivitet af enzymcomplexet  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$ fugtig vægt
6	4,9	30,2
7	5,1	21,2
8	5,3	40,8
9	5,5	49,0
25 10	5,7	57,2
11	5,7	44,4
12	5,9	13,0
13	6,1	8,4
14	6,3	5,6
30 15	6,5	5,6

Eksempel 16 og 17.

Disse eksempler viser virkningen af anvendelse af samme harpiks men med forskellig partikelstørrelse. Der anvendes en chromatografisk kvalitet af harpiksen "Amberlite" IRC-50, dvs. "Amberlite" CG-50 type I med en partikelstørrelse, som passerer en 100 A.S.T.M. sigte, men som tilbageholdes på en 200 A.S.T.M. sigte, dvs. en partikelstørrelse på 0,074-0,149 mm.)

En prøve (15 g) af harpiksen lades adsorbere enzym (200 ml, 23,7  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ ; 3,86  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  protein) ved pH-værdi 6,3 i 3 timer. Enzymcomplexet fraskilles, behandles med glutaraldehyd (200 ml, 0,825% w/v) i 16 timer, isoleres og vaskes som beskrevet i eksempel 1. Produktet (21 g) har en aktivitet på 114,5  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$  fugtig vægt, og dette skal sammenlignes med det i eksempel 2 opnåede resultat, hvor "Amberlite" IRC-50 anvendes med partikelstørrelse, som passerer en 14 A.S.T.M. sigte, men som tilbageholdes på en 50 A.S.T.M. sigte (dvs. med en partikelstørrelsesdiameter på 0,297-1,41 mm). Dette viser, at der opnås forbedrede resultater, når harpiksen er af den mindre størrelse.

Forsøget gentages under anvendelse af en farmaceutisk kvalitet af "Amberlite", nemlig "Amberlite" IRP-64 med en partikelstørrelse, som passerer en 100 A.S.T.M. sigte, men som tilbageholdes på 500 A.S.T.M. sigte, dvs. en partikelstørrelse på < 0,037-0,149 mm diameter. Harpiksen lades adsorbere enzym (3920  $\mu\text{M}/\text{min}$  g harpiks; specifik aktivitet 17,4  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  protein) ved pH-værdi 6,3. Enzymcomplexet omsættes derefter med glutaraldehyd (3,3% w/v) og behandles som beskrevet i eksempel 1. Det resulterende enzym-harpikscomplex har en specifik aktivitet på 478,4  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$  fugtig vægt.

Eksempel 18.

pH-Værdien af "Amberlite" IRC-50-harpiks indstilles på 5,5, enten ved vaskning med 0,2M fosfatpuffer med denne pH-værdi eller ved opløsning i destilleret vand og tilsætning af natriumhydroxidop-

løsning. Harpiksen vaskes derefter yderligere med destilleret vand, indtil der ikke længere kan konstateres ændring i vandets lednings-  
evne.

Den fugtige harpiks (100 g) sættes til penicillinacylasen med aktivitet 5,25  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  protein i 500 ml 0,02M fosfatpuffer med en pH-værdi 5,5 og omrøres i 20 timer ved stuetemperatur. Det faste stof fraskilles ved filtrering, gensuspenderes i 500 ml 0,25% w/v glutaraldehyd opløst i fosfatopløsningen og omrøres i yderligere 20 timer ved stuetemperatur. Det resulterende enzymcomplex fraskilles derefter ved filtrering og vaskes med 0,2M fosfatpufferopløsning ved pH-værdi 7,8, indtil harpiksen er ækvilibreret ved denne pH-værdi.

Det på denne måde fremstillede enzymcomplex (15 g) anvendes derefter til spaltning af 200 ml en 6,25% w/v vandig opløsning af benzylpenicillin i 0,02M fosfatpuffer med en pH-værdi på 7,8 i 2 timer ved 37°C. Det viser sig, at enzymcomplexet let kan genvindes til genanvendelse, og at den mekaniske og biologiske stabilitet begge bibeholdes i en sådan grad, at complexet kan genanvendes mindst 25 gange.

#### 20 Eksempel 19.

Dette eksempel illustrerer bedre anvendelsen af et enzymcomplex ifølge opfindelsen i produktion i stor målestok af 6-APA og complexets fremragende genanvendelighed under disse betingelser.

Der fremstilles et enzymcomplex under anvendelse af "Amberlite" IRC-50. Det har en aktivitet på 26,3  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$ , og anvendes til spaltning af 40 liter benzylpenicillinopløsning med koncentration 6,5% w/v i 0,02M fosfatpuffer. Enzymcomplexet tilbageholdes i beholderen ved hjælp af en trådsigte. Når reaktionen er tilendebragt, frafiltreres opløsningen af 6-APA-produkt, complexet vaskes med vand, og en yderligere reaktion sættes i gang. Den gennemsnitlige effektivitet med hensyn til omdannelse til 6-APA ved 50 successive genanvendelser, hver på 6 timers varighed, er 95%.

## Eksempel 20.

5 Dette eksempel illustrerer den mekaniske stabilitet af et enzym-complex ifølge opfindelsen fremstillet som beskrevet i eksempel 1 ud fra harpiksen "Amberlite" IRC-50 sammenlignet med et enzymcomplex fremstillet på lignende måde, men ud fra et polymersubstrat med neutral aktivitet, nemlig harpiksen XAD-7, som er en tværbunden acrylatester, som er i handelen (Rohm & Haas Corp. U.S.A.).

10 En prøve af hvert enzymcomplex (1,6 kg) suspenderes i 8 liter 0,2M phosphatpuffer ved pH-værdi 7,8 og 37°C, og hver blanding omrøres i 72 timer ved 200 omdrejninger pr. minut i en New Brunswick Magnaferm fermentor med preplader. Der udtages prøver med intervaller på 4 timer, og prøverne undersøges visuelt til konstatering af nedbrydning af harpikskuglerne. Nedbrydningen af XAD-7-kuglerne er væsentlig større end nedbrydningen af IRC-50-kuglerne, således at en prøve af 15 den sidstnævnte taget efter 64 timers forløb ligner en prøve af XAD-7-harpiks taget efter 8 timers forløb. Disse resultater viser klart den større mekaniske styrke af IRC-50-harpiks.

## Eksempel 21.

20 "Amberlite" IRC-50 (235 g, 39,4  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$ ), fremstillet som beskrevet i eksempel 1, anvendes til spaltning af 6,25% w/v kaliumbenzylpenicillin G i en serie på 10 på hinanden følgende forsøg. Hvert forsøg udføres under anvendelse af 1 liter kaliumbenzylpenicillin G i 2 1/2 time ved 37°C og ved en pH-værdi på 7,8. "Amberlite" IRC-50-harpiksen fjernes ved filtrering efter hvert forsøg og vaskes med destilleret 25 vand. Filtratet og vaskevandet koncentrerer ved inddampning på roterende vakuuminddamper, og koncentratet blandes med et lige så stort rumfang methyloisobutylketon, afkøles til 4-10°C og syrnes til slut til udfældning af 6-aminopenicillansyre. 6-Aminopenicillansyren vaskes med en ringe mængde destilleret vand, vaskes med acetone og 30 ovntørres. Det gennemsnitlige vægtudbytte af 6-aminopenicillansyre ved de 10 forsøg er 91,3%.

## Eksempel 22.

Adsorption af acylaseenzym til urethan-overtrukket polyethylen.

Partikler af polyethylen med lav massefylde ( $<400 \mu\text{m}$ ) overtrækkes med en urethanpolymer ("Urithane" 641W, Gray Valley Products Limited) og lades tørre i 10 dage. Materialet vaskes derefter i 1 time med 20% v/v vandig acetoneopløsning og skylles omhyggeligt med destilleret vand, og prøver på hver 5 g lades adsorbere enzym ( $125 \text{ ml}$ ,  $54,0 \mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ ,  $3,80 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  protein) i 5 timer i pH-værdiområdet 4,8-9,0. De urethan-overtrukne partikler fraskilles ved filtrering, behandles med glutaraldehyd ( $75 \text{ ml}$ ,  $3,3\%$  w/v) i 3 timer og ækvilibreres derefter til pH-værdi 7,8 som beskrevet i eksempel 1.

På trods af, at de urethan-overtrukne partikler i gennemsnit har mindre størrelse end IRC-50, er de opnåede specifikke aktiviteter 2-3 gange mindre end dem, der opnås ved anvendelse af IRC-50.

15	pH-Værdi	Aktivitet, fugtig vægt $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$
----	----------	---

	4,8	11,3
	5,2	14,0
20	5,6	16,4
	6,0	13,2
	6,4	13,6
	7,0	12,3
	7,5	7,8
25	8,0	10,0
	8,5	9,0
	9,0	12,2

## Eksempel 23.

## Adsorption af acylaseenzym til nylon.

"Orgolacq" (pulveriseret nylon 6, diameter  $<30 \mu\text{m}$ , Ato Chimie (U.K.) Limited) vaskes i 1 time med 65% w/v myresyre og skylles derefter omhyggeligt med destilleret vand. Prøver på hver 10 g lades adsorbere enzym (100 ml,  $50,9 \mu\text{M}/\text{min}/\text{ml}$ ,  $4,7 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  protein) i 16 timer i pH-værdiområdet 4,8-9,0. Det pulveriserede nylon fjernes ved filtrering, behandles med glutaraldehyd (100 ml, 3,3% w/v) i 3 timer og fraskilles og vaskes som beskrevet i eksempel 1. Den højeste opnåede aktivitet (pH-værdi 4,8) er  $41,7 \mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$  fugtig vægt, hvilket er sammenligneligt med et typisk præparat af IRC-50. Når imidlertid forskellen i partikelstørrelse mellem nylonet og IRC-50 tages i betragtning, ses det, at IRC-50 er langt overlegen. Således kan IRP 64 (farmaceutisk kvalitet af IRC-50, partikelstørrelse  $0,037-0,149 \mu\text{m}$ ) kobles med acylase til opnåelse af præparater med specifik aktivitet på  $478 \mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$  fugtig vægt, mere end 11 gange større end nylonpræparaternes aktivitet.

pH-Værdi	Aktivitet, fugtig vægt $\mu\text{M}/\text{min}/\text{g}$
4,8	41,7
5,2	36,1
5,6	26,9
6,0	22,2
6,4	15,7
7,0	17,6
7,5	17,6
8,0	21,3
8,5	15,7
9,0	9,3

Patentkrav.

1. Vanduopløseligt enzymcomplex, som omfatter et penicillinacylase-enzym adsorberet på et vanduopløseligt polymersubstrat og tværbundet med et tværbindingsmiddel, som er glutaraldehyd, glyoxal eller formaldehyd,  
5 k e n d e t e g n e t ved, at polymersubstratet er en vanduopløselig eventuelt tværbundet homopolymer eller copolymer af methacrylsyre.
2. Enzymcomplex ifølge krav 1,  
k e n d e t e g n e t ved, at enzymrenheden er i området 1,5-30  
10 mikromol/min/mg protein.
3. Enzymcomplex ifølge krav 1 eller 2,  
k e n d e t e g n e t ved, at substratet er i makroporøs form.
4. Enzymcomplex ifølge krav 1, 2 eller 3,  
k e n d e t e g n e t ved, at substratet er en copolymer af methacrylsyre og divinylbenzen.  
15
5. Enzymcomplex ifølge krav 4,  
k e n d e t e g n e t ved, at den polymere eller copolymere indeholder benzensulfonylgrupper.
6. Enzymcomplex ifølge krav 4,  
20 k e n d e t e g n e t ved, at substratet er en svagt sur, carboxylisk kationbytterharpiks, der kun har neglignel kapacitet ved pH under 4, og hvis saltform kan regenereres særdeles effektivt med syre, og som har en partikelstørrelse i våd H<sup>+</sup>-form på 16-50 mesh, en initial kvældning (H<sup>+</sup>-form→Na<sup>+</sup>-form) på 100%, en reversibel kvældning (H<sup>+</sup>-form→Na<sup>+</sup>-form) på 70%, en ionbytningskapacitet på 10,0 milliækvivalenter/g (3,5 milliækvivalenter/ml) og en tilsyneladende pKa-værdi på  
25 5,9.
7. Enzymcomplex ifølge et hvilket som helst af kravene 1-6,  
k e n d e t e g n e t ved, at det er i form af findelte partikler  
30 eller småkugler med partikelstørrelse i området 2,0-0,01 mm.

8. Fremgangsmåde til fremstilling af 6-aminopenicillansyre, ved hvilken benzylpenicillin eller phenoxymethylpenicillin eller et salt deraf i vandig opløsning, som holdes ved en pH-værdi fra 6,0 til 9,0, behandles med et vanduopløseligt enzymcomplex, hvilket enzymcomplex
- 5 omfatter et penicillinacylaseenzym adsorberet på et vanduopløseligt polymersubstrat og tværbundet med et tværbindingsmiddel, som er glutaraldehyd, glyoxal eller formaldehyd, k e n d e t e g n e t ved, at polymersubstratet er en vanduopløselig eventuelt tværbundet homopolymer eller copolymer af methacrylsyre.
- 10 9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at penicillinacylaseenzymets renhed ligger i området 1,5-30 mikromol/min/mg protein.
10. Fremgangsmåde ifølge krav 8 eller 9, k e n d e t e g n e t ved, at substratet er i makroporøs form.
- 15 11. Fremgangsmåde ifølge krav 8, 9 eller 10, k e n d e t e g n e t ved, at substratet er en copolymer af methacrylsyre og divinylbenzen.
12. Fremgangsmåde ifølge krav 11, k e n d e t e g n e t ved, at den polymere eller copolymere også
- 20 indeholder benzensulfonylgrupper.
13. Fremgangsmåde ifølge krav 11, k e n d e t e g n e t ved, at substratet er en svagt sur carboxylisk kationbytterharpiks, der kun har neglignel kapacitet ved pH under 4, og hvis saltform kan regenereres særdeles effektivt med syre, og som
- 25 har en partikelstørrelse i våd  $H^+$ -form på 16-50 mesh, en initial kvældning ( $H^+$ -form  $\rightarrow$   $Na^+$ -form) på 100%, en reversibel kvældning ( $H^+$ -form  $\rightarrow$   $Na^+$ -form) på 70%, en ionbytningskapacitet på 10,0 milliækvivalenter/g (3,5 milliækvivalenter/ml) og en tilsyneladende  $pK_a$ -værdi på 5,9.



14. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 8-13, k e n d e t e g n e t ved, at enzymcomplexet er i form af findelte partikler eller småkugler med partikelstørrelse i området 2,0-0,01 mm.
- 5 15. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 8-14, k e n d e t e g n e t ved, at reaktionstemperaturen er i området 30-50°C, og at pH-værdien holdes i området 7,0-8,5 ved kontinuerlig eller periodisk tilsætning af natriumhydroxid.