

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

94970

Patent dodatkowy
do patentu _____

MKP C07d 99/14

Zgłoszono: 27.12.74 (P. 176893)

Pierwszeństwo: 28.12.73 Wielka
Brytania

Int. Cl². C12D 9/00

Zgłoszenie ogłoszono: 01.12.75

Opis patentowy opublikowano: 31.12.1977



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Beecham Group Limited, Brentford (Wielka Brytania)

Sposób wytwarzania kwasu 6-aminopenicylanowego

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania kwasu 6-aminopenicylanowego zwanego dalej 6-APA.

Znane jest, że pewne enzymy zdolne są do rozszczepiania wiązania amidowego w penicylinach. Takie enzymy są cenne dla przemysłowego wytwarzania 6-APA z naturalnie występujących penicylin uzyskiwanych w procesach fermentacyjnych.

Obecnie stwierdzono, że w procesie wytwarzania 6-APA można stosować pewne nierozpuszczalne w wodzie kompleksy enzym-polimer, które nie tylko mają bardzo korzystną aktywność enzymatyczną ale także bardzo dobrą stabilność mechaniczną i chemiczną. Z powodu tak dobrej aktywności enzymatycznej, kompleksy takie są bardzo wydajne przy konwersji naturalnych penicylin do 6-APA, a ze względu na stabilność mechaniczną i chemiczną takie kompleksy mogą być wielokrotnie stosowane bez straty enzymatycznej aktywności. Dzięki temu sposób według wynalazku jest dużo efektywniejszy od znanych sposobów wytwarzania 6-APA.

Sposobem według wynalazku wytwarza się kwas 6-aminopenicylanowy przez reakcję benzylopenicyliny lub fenoksybenzylopenicyliny albo ich soli w wodnym roztworze przy pH w granicach 6,0–9,0, z nierozpuszczalnym w wodzie kompleksem enzym-substrat składającym się z enzymu zwanego penicylinazą, zaadsorbowanego na substracie, którym jest nierozpuszczalny w wodzie polimer, związany poprzecznie czynnikiem sieciującym, takim jak aldehyd glutarowy, glioksal i aldehyd mrówkowy, przy czym, substratem tym jest nierozpuszczalny w wodzie polimer lub kopolimer kwasu metakrylowego.

Wymienione wyżej kompleksy otrzymuje się przez adsorpcję enzymu – penicylinazy na nierozpuszczalnym w wodzie polimerze lub kopolimerze kwasu metakrylowego, a następnie, reakcję z czynnikiem sieciującym, takim jak aldehyd glutarowy, glioksal i aldehyd mrówkowy.

Stosowany w niniejszym sposobie wytwarzania 6-APA z benzylopenicyliny enzym-acylazę korzystnie jest uzyskiwać z bakterii, takich jak szczepy *Escherichia coli* lub, w przypadku stosowania jako substancji wyjściowej fenylloksymetylopenicyliny – z niższych roślin zarodnikowych lub promieniowców.

Aktywność enzymatyczną deacylazy określa się zwykle na podstawie zdolności do wytwarzania 6-APA z benzylopenicyliny. Tak więc, aktywność enzymów deacylazy oznacza się jako ilość 6-APA (w mikromolach- μ m)

uzyskaną w ciągu minuty z roztworu benzylopenicyliny o pH 7,8 i temperaturze 37°C, przypadającą na miligram białka zawartego w enzymie. Zawartość białka w enzymie oznacza się standardową metodą Lowry'ego. Aktywność enzymatyczną kompleksów enzym-substrat według wynalazku oznacza się w podobny sposób jako ilość 6-APA (w μm) wytworzoną w ciągu minuty z roztworu benzylopenicyliny o pH 7,8 i temperaturze 37°C, przypadającą na gram kompleksu enzym-substrat.

Jak stwierdzono, wydajność adsorpcji, reakcji wiązania poprzecznego, oraz aktywność wytworzonego, nierozpuszczalnego w wodzie kompleksu enzym-substrat wzrasta w przypadku gdy używa się czystszeo enzymu wyjściowego. Jednakże, z uwagi na to iż niektóre korzyści wynikające z użycia czystszeo enzymu wyjściowego rosną wolniej niż wynikałoby to ze wzrostu czystości użytego enzymu, oraz z uwagi na ograniczenia związane z ekonomią procesu, używa się deacylazy o czystości w granicach od 0,15 do 50 mikromoli/min/mg białka zawartego w enzymie, a korzystnie w granicach od 1,5 do 30 mikromoli/min/mg białka.

Korzystne jest zwiększenie czystości enzymu przed adsorpcją i reakcją wiązania poprzecznego. Można to uzyskać na drodze ultrafiltracji lub ogrzewania roztworu enzymu w ciągu krótkiego czasu, np. w ciągu około 30 minut, w temperaturze około 50°C. Inne, typowe sposoby oczyszczania enzymu to strącanie frakcjonowane lub obróbka przy pomocy jonowymiennych celuloz lub Sephadex'u.

W szczególności według wynalazku substratem są polimery lub kopolimery kwasu metakrylowego. Zawierają one wolne grupy karboksylowe, co powoduje, że polimer ten ma charakter kwasowy. Jako substraty preferowane są raczej makroporowate polimery i kopolimery kwasu metakrylowego niż żele dimerów i kopolimerów tego kwasu.

Jest rzeczą pożądaną, by polimery kwasu metakrylowego były nierozpuszczalne w wodzie oraz by posiadały postać kopolimerów usieciowanych. Jako przykłady takich polimerów mogą służyć kopolimery kwasu metakrylowego z dwuwinylobenzenem lub dwuistry kwasu metakrylowego z glikolem, np. dwumetakrylan glikolu etylenowego. Do wytwarzania powyższych kopolimerów można również używać innych komonomerów, takich jak estry kwasu metakrylowego.

Jedną z korzyści wynikających z niniejszego wynalazku jest to, iż można używać jako substratów takich polimerów które są produktami handlowymi stosowanymi do różnych celów, zwłaszcza jako kationity o charakterze słabo kwaśnym. Szczególnie przydatny jest tu kopolimer kwasu metakrylowego i dwuwinylobenzenu sprzedawany przez f-mę Rohm and Haas Co. ze Stanów Zjednoczonych AP pod nazwą Amberlite IRC-50, oraz kopolimer kwasu metakrylowego sprzedawany dawniej przez f-mę Permutit Co. Ltd. pod nazwą Zeokarb 227. Ten ostatni jest kopolimerem dwuwinylobenzenu i kwasu metakrylowego zawierającym również pewną ilość grup benzenosulfonylowych.

Polimery będące substratami w sposobie według wynalazku stosuje się korzystnie w postaci drobnoziarnistej tj. zawierającej cząstki o takich rozmiarach, by przechodziły przez sito 10 ASTM, a więc, cząstki o średnicach poniżej 2,0 mm. Jednakże, uzyskiwany sposobem według wynalazku kompleks enzym-substrat powinien posiadać cząstki o większych rozmiarach, w przeciwnym razie nie mógłby być wydzielany z mieszaniny poreakcyjnej na drodze odsiewania, lub stosowany w reaktorze kolumnowym. Tak więc, polimer powinien składać się z cząstek o wymiarach większych od 0,01 mm tj. powinien być w całości zatrzymywany na sicie 800 ASTM. Wybór odpowiedniego rozmiaru cząstek z podanego wyżej zakresu zależy będzie od rodzaju stosowanego reaktora.

Acyłaza przygotowana do reakcji z polimerem powinna stanowić roztwór wodny, który został wcześniej poddany dializie w celu obniżenia przewodnictwa jonowego od wartości 5–10 m siemensów do około 0,1–5 m siemensów, korzystnie około 1 m siemensa. Roztwór enzymu powinien korzystnie posiadać pH 4,5–7,0; dla określenia optymalnej wartości pH roztworu tj. wartości przy której uzyskuje się maksymalną adsorpcję i aktywność enzymu, może zająć konieczność przeprowadzenia kilku doświadczeń. Zwykle jednak, optymalna wartość pH zawiera się w granicach 5,2–6,5. Czas zetknięcia polimeru z roztworem enzymu powinien być wystarczająco długi, by uzyskać maksymalną adsorpcję enzymu; zwykle wynosi on od 2 do 16 godzin.

Po zaadsorbowaniu na substracie, enzym sieciuje się in situ, poddając go reakcji z czynnikiem sieciującym, takim jak aldehyd glutarowy, glioksal lub aldehyd mrówkowy, przy czym preferowane jest stosowanie aldehydu glutarowego lub glioksalu. Aldehyd glutarowy nadaje kompleksowi enzym-substrat własności szczególnie korzystne w przypadku stosowania go do produkcji 6-APA. Czynnika sieciującego używa się zwykle w roztworze wodnym w stężeniu 0,1–15% wagowych, a korzystnie 0,5–5,0% wag.

Po zakończeniu reakcji sieciowania należy usunąć całą resztę nieprzereagowanego czynnika sieciującego. Można to uzyskać przemywając produkt wodą lub roztworem pochodnej aminowej; jak stwierdzono, doskonałym środkiem do tego celu jest mocznik.

Przed użyciem kompleksu enzym-substrat w procesie wytwarzania 6-APA należy doprowadzić ostrożnie jego pH do wartości w granicach 6,0–9,0 zwykle 7,0–8,5 (preferowana wartość pH kompleksu wynosi 7,8);

uzyskuje się to zwykle przez dodanie do mieszaniny po zakończeniu reakcji sieciowania, zasady. Uzyskany kompleks enzym-substrat poddaje się reakcji z wodnym roztworem (o odpowiednim pH) benzylopenicyliny lub fenoksymetylopenicyliny lub ich soli, w temperaturze 30–50°, korzystnie w temperaturze 37°C. W trakcie reakcji z benzylopenicyliny wydziela się kwas fenylooctowy, a z fenoksymetylopenicyliny – kwas fenoksyoctowy. W celu utrzymania pH mieszaniny w odpowiednich granicach, wydzielające się kwasy zobojętnia się w sposób ciągły lub periodyczny. Jak już stwierdzono, dobór odpowiedniej zasady do tego celu nie jest sprawą istotną. Zwykle używa się wodorotlenku sodu, chociaż można również używać lotnych zasad aminowych, takich jak amoniak lub trójetyloamina.

Nierozpuszczalne w wodzie kompleksy enzymowe stosowane w sposobie według wynalazku są wystarczająco trwałe – i to zarówno pod względem mechanicznym, jak i biologicznym. W związku z tym umożliwiają przeprowadzenie co najmniej 40 kolejnych reakcji rozerwania wiązania amidowego penicyliny w działającym periodycznie reaktorze.

Sposób według wynalazku ilustrują podane niżej przykłady, które także ilustrują wysoką aktywność enzymatyczną oraz użyteczność kompleksów w połączeniu z innymi kompleksami enzym-polimer. W przykładach tych stosuje się częściowo oczyszczony enzym acylazę – uzyskany na drodze mechanicznej w homogenizatorze, z komórek wytwarzających acylazę szczepów bakterii *Escherichia coli* NC 1B 8734.

Po doprowadzeniu mieszaniny do pH 5 szkielety komórek odsąca się, a uzyskany roztwór enzymu oczyszcza się dalej w stopniu niezbędnym do uzyskania odpowiedniej aktywności (tj. od 1,5 do 30 mikromoli/min/mg białka). Następnie, roztwór enzymu poddaje się dializie aż do uzyskania przewodności około 1 m siemensa.

Przykład 1. 20,25 lub 50 g podwielokrotności dostępnych w handlu kationitów i anionitów dysperguje się w 100–500 ml destylowanej wody i dodaje, energicznie mieszając, taką ilość wodorotlenku sodu lub kwasu chlorowodorowego, by doprowadzić pH mieszaniny – w przypadku kationitów – do wartości w granicach 4,4–6,3, a w przypadku anionitów – do wartości w granicach 6,5–9,0. Następnie żywice odsąca się, przemywa dokładnie destylowaną wodą i ponownie dysperguje w roztworze 60–100, 250 lub 500 ml częściowo oczyszczonej penicylinazy o aktywności 3,85–6,75 mikromoli/min/mg białka i o przewodności < 1 mS dostosowanej do odpowiedniej wartości pH.

Ilość enzymu adsorbowanego na żywicy waha się od 71 do 308 mikromoli/min/g żywicy. Mieszaninę pozostawia się, lekko wstrząsając i dodając roztworu mianowanego w celu utrzymania odpowiedniego pH, w ciągu 16 godzin, w celu zaadsorbowania enzymu na żywicy, a następnie przesąca. Odsączone żywice dysperguje się w 100 ml 0,825–3,3% (wag./obj.) roztworu aldehydu glutarowego w wodzie, i pozostawia, dodając roztworu mianowanego w celu utrzymania odpowiedniego pH, w ciągu 16 godzin do przereagowania. Uzyskane kompleksy enzym-żywica odsąca się, przemywa trzykrotnie wodą destylowaną, dysperguje w wodzie lub 0,2 m roztworze buforu fosforanowego o pH 7,8, doprowadza pH mieszaniny do wartości 7,8 i poddaje w ciągu 1 godziny reakcji ze 100 ml 0,1 m wodnego roztworu mocznika o pH = 7,8, po czym przemywa trzykrotnie wodą destylowaną.

Każdego z tak wytworzonych kompleksów używa się w procesie wytwarzania 6-APA z benzylopenicyliny, prowadzonego w typowych warunkach: przy pH = 7,8 i w temperaturze 37°C. Aktywności stosowanych kompleksów podane są w tabeli I i odnoszą się do kompleksów wytworzonych przy pH optymalnym dla adsorpcji enzymu i utrzymania jego aktywności.

Zywice Bio-Rex i Chelex są produktami handlowymi f-my Bio-Rad Laboratories of California, ze Stanów Zjednoczonych AP; żywice Lewatit są produktami handlowymi f-my Bayer AG z RFN; żywice Zeokarb i Zerolit są produktami handlowymi f-my The Permutit Co. Ltd., a żywice Amberlite są produktami handlowymi f-my Rohm and Haas, Philadelphia, ze Stanów Zjednoczonych AP. Należy zauważyć, że korzyści wynikające z wysokiej aktywności i stabilności ograniczone są do przypadków, w których substratem jest polimer lub kopolimer kwasu metakrylowego.

Tabela I

Doświad- czenie	Rodzaj monomeru oraz grup funkcyjnych żywicy	Żywica	Fizyczna postać żywicy	Aktywność kompleksu enzym-żywica przy optymalnej wartości pH	
				m/min/g subst. mokrej	m/min/g subst. suchej
1	2	3	4	5	6
a	Styren-czwartorzędowe amonowe	Amberlite IRA-938	Makroporowata	10,4	32,4
b	Styren-czwartorzędowe amonowe	Amberlite IRA-401	Żel	2,3	5,8
c	Arylan-czwartorzędowe amonowe	Amberlite IRA-458	Żel	4,71	10,1
d	Styren-poliaminowe	Lewatit MP62	Makroporowata	15,1	30,7
e	Styren-poliaminowe	Amberlite IR-45	Żel	2,3	5,8
f	Akrylan-poliaminowe	Amberlite IRA-68	Żel	2,3	5,8
g	Styren-SO ₃ H	Lewatit SP120	Makroporowata	19,3	39,2
h	Styren-SO ₃ H	Lewatit S100	Żel	2,3	5,8
i	Styren-SO ₃ H	Zerolit 325	Żel	2,3	5,8
j	Styren-SO ₃ H	Amberlite IR-120	Żel	2,3	5,8
k	Fenol-formaldehyd-SO ₃ H	Bio-Rex 40	Żel	4,01	8,3
l	Styren-SO ₃ H	Bio-Rad AG/MP/50	Makroporowata	9,9	19,8
m	Styren-PO ₃ H ₂	Bio-Rex 63	Żel	2,3	
n	Styren-CH ₂ -N/CH ₂ -COOH/2	Chelex 100	Żel	7,16	30,1 ⁴
o	Metakrylan-COOH	Amberlite IRC-50	Makroporowata	37,0	88,8
p	Akrylan-COOH	Amberlite IRC-72	Makroporowata	ca. 8,0	ca. 24,0 ¹
q	Akrylan-COOH	Amberlite IRC-84	Żel	7,0	13,9
r	Akrylan-COOH	Zerolit 236	Żel	ca. 8,0	ca. 17,1 ¹
s	+ ² -COOH	Lewatit CHP-80	Makroporowata	15,2	36,5
t	+ ² -COOH	Lewatit CHP	Makroporowata	2,3	5,8
u	Fenol-formaldehyd- OH COOH	Zerolit 216	Żel	2,3	5,8
v	Polimetakrylan- COOH ³ SO ₃ H	Zeokarb 227	Żel	25,9	57,0

Uwagi: ¹ Wyniki bardzo różniące się między sobą, obliczone wartości są średnią z kilku oznaczeń.

² Nieznana budowa polimeru.

³ Żywica niedostępna w handlu.

⁴ Wielkość cząstek — 200 mesh; dla innych żywic 14,50 mesh

Żywice a—c mają charakter silnie zasadowy

Żywice d—f mają charakter słabo zasadowy

Żywice g—l mają charakter silnie kwasowy

Żywice o—u mają charakter słabo kwaśny

Tabela II

Przykład	Aktywność enzymu wyjściowego m/min/mg białka	Szybkość adsorpcji enzymu na żywicy m/min/g żywicy	Aktywność kompleksu enzym-żywica m/min/g subst. suchej
II	4,64	216	38,1
III	7,87	463	72,0
IV	20,5	1160	124,0
V	18,2	586	109,0

Przykłady II–V. Poniższe przykłady ilustrują efekt wywołany różną czystością używanej w procesie adsorpcji acylazy. Stosuje się tu sposób opisany w przykładzie I. Enzym adsorbuje się przy pH = 5,7. Uzyskany kompleks enzym – żywica poddaje się reakcji z 3,3% (wag/obj.) roztworem aldehydu glutarowego. W doświadczeniach używa się żywicy „Amberlite IRC-50” przemysłowej najpierw zasadą, a następnie kwasem. W tabeli II podane są aktywności uzyskanych tym sposobem kompleksów enzym-substrat. Uzyskane wyniki wskazują, że w badanym zakresie zwiększenie czystości enzymu wyjściowego powoduje wzrost aktywności uzyskiwanego kompleksu.

Tabela III

Przykład	pH	Aktywność kompleksu enzym-substrat mikromoli/min/g subst. wilgotnej
VI	4,9	30,2
VII	5,1	21,2
VIII	5,3	40,8
IX	5,5	49,0
X	5,7	57,2
XI	5,7	44,4
XII	5,9	13,0
XIII	6,1	8,4
XIV	6,3	5,6
XV	6,5	5,6

Przykłady VI–XV. Poniższe przykłady służą jako ilustracja wpływu pH środowiska w którym zachodzi proces adsorbowania enzymu na żywicy, na produkt białkowy. Przeprowadza się następujące doświadczenia:

/a/ Pięć podwielokrotności 50 g żywicy „Amberlite IRC-50” doprowadza się odpowiednio do pH = 4,9; 5,1; 5,3; 5,5 i 5,7, suszy i miesza (każdą) z 200 ml roztworu zawierającego 95 ml częściowo oczyszczonej penicylinazy o aktywności 60,9 mikromola/min/ml i przewodności 0,55 mS, która zawiera w 1 ml 16,8 mg białka. Adsorpcję prowadzi się w ciągu 16 godzin, po czym – uzyskany kompleks poddaje obróbce w sposób opisany w przykładzie I. lub

/b/ Pięć dalszych podwielokrotności żywicy „Amberlite IRC-50” poddaje się obróbce w opisany wyżej sposób, z tą tylko różnicą, że adsorpcję prowadzi się w środowisku o pH w granicach 5,7–6,5. Do adsorpcji używa się 105 ml enzymu o aktywności 54,7 mikromola/min/ml i przewodności 0,75 mS, który zawiera w 1 ml 16,8 mg białka.

Uzyskane wyniki podane są w tabeli III. Wskazują one, że optymalna wartość pH dla procesu adsorpcji

zawiera się w granicach 5,2–5,8.

Przykłady XVI–XVII. Poniższe przykłady służą jako ilustracja skutków wynikających z użycia żywicy o innych rozmiarach cząstek. W pierwszym przypadku używa się żywicy Amberlite IRC-50 składającej się z cząstek o rozmiarach stosowanych w chromatografii np. z cząstek przechodzących przez sito 100 A.S.T.M. a zatrzymanych na sicie 200 A.S.T.M. (tj. z cząstek o rozmiarach 0,74–0,149 mm).

15 g podwielokrotności żywicy poddaje się w ciągu 3 godzin, przy pH = 6,7, procesowi adsorpcji 200 ml enzymu (23,7 mikromola/min/ml; 3,86 mikromola/min/mg białka). Uzyskany kompleks odsącza się i poddaje, w ciągu 16 godzin, działaniu 200 ml 0,825% (wag/obj) roztworu aldehydu glutarowego, a następnie wydziela z mieszaniny i przemywa w sposób opisany w przykładzie I. Uzyskuje się 21 g produktu o aktywności 114,5 mikromola/min/g substancji wilgotnej. Porównując uzyskany produkt z produktem z przykładu II, w którym użyto żywicy „Amberlite IRC-50” składającej się z cząstek przechodzących przez sito 14 A.S.T.M. a zatrzymanych na sicie 50 A.S.T.M. (tj. cząstek o średnicach 0,297–1,41 mm) można zauważyć, że lepsze wyniki uzyskuje się w przypadku użycia żywicy o mniejszych rozmiarach cząstek.

Doświadczenie powtarza się z żywicą składającą się z cząstek o rozmiarach stosowanych w farmacji tj. z żywicą „Amberlite IRP-64” składającą się z cząstek przechodzących przez sito 100 A.S.T.M. a zatrzymanych na sicie 500 A.S.T.M. (a więc, z cząstek o średnicach 0,037–0,149). Żywicę tę poddaje się przy pH = 6,3 adsorpcji enzymem (3920 mikromoli/min/g żywicy, aktywność = 17,4 mikromoli/min/mg białka). Uzyskany kompleks enzym-żywica poddaje się reakcji z 3,3% (wag/obj) roztworem aldehydu glutarowego, po czym obrabia w sposób opisany w przykładzie I. W wyniku uzyskuje się kompleks enzym-żywica o aktywności 478,4 mikromola/min/g subst. wilgotnej.

Przykład XVIII. Przemywając żywicę „Amberlite IRC-50” 0,2 m roztworem buforu fosforanowego o pH = 5,5, lub mieszając ją z wodą destylowaną i dodając roztworu wodorotlenku sodu, doprowadza się jej pH do wartości 5,5. Następnie, żywicę przemywa się tak długo wodą destylowaną, aż przestanie się zauważać zmiany jej przewodności.

100 g wilgotnej żywicy dodaje się do roztworu penicylinazy o aktywności 5,25 mikromola/min/mg białka w 500 ml 0,02 m roztworu buforu fosforanowego o pH = 5,5 i miesza w ciągu 20 godzin w temperaturze pokojowej. Wytrącony osad odsącza się, dysperguje w 500 ml 0,25% (wag/obj) roztworu aldehydu glutarowego rozpuszczonego w roztworze buforu fosforanowego i miesza w ciągu 20 godzin w temperaturze pokojowej. Uzyskany kompleks enzym-żywica odsącza i przemywa tak długo 0,2 m roztworem buforu fosforanowego o pH = 7,8, aż żywica osiągnie taką samą wartość pH.

15 g wytworzonego w ten sposób kompleksu używa się w reakcji rozszczepienia 200 ml 6,25% (wag/obj) wodnego roztworu benzylopenicyliny w 0,02 m roztworze buforu fosforanowego, reakcji prowadzonej w ciągu 2 godzin w temperaturze 37°C i przy pH = 7,8. Jak stwierdzono, powyższy kompleks można łatwo odzyskiwać z mieszaniny poreakcyjnej i stosować ponownie. Przy tym, jego własności mechaniczne i biologiczne pozostają niezmienione, co pozwala na co najmniej 25-krotne używanie tego kompleksu w reakcjach rozszczepiania penicylin.

Przykład XIX. Przykład ten służy jako ilustracja sposobu stosowania wytwarzanego sposobem według wynalazku kompleksu enzym-substrat w prowadzonej na wielką skalę produkcji 6-APA, oraz sposobu ponownego użycia niniejszego kompleksu w warunkach produkcyjnych.

Kompleks enzym-substrat o aktywności 26,3 mikromola/min/g wytwarza się z żywicy „Amberlite IRC-50” i stosuje w reakcji rozszczepiania 40 litrów 6,5% (wag/obj) roztworu benzylopenicyliny w 0,02 m buforu fosforanowego. Po reakcji kompleks pozostaje w reaktorze (zaopatrzonym w tym celu w drucianą siatkę), a odsączony produkt, którym jest roztwór 6-APA, poddaje się dalszej przeróbce. Kompleks, po przemyciu wodą, można stosować w dalszych reakcjach. Przeciętna wydajność 50 kolejnych (z tym samym kompleksem) reakcji konwersji do 6-APA, prowadzonych w ciągu 6 godzin każda, wynosi 95%.

Przykład XX. Przykład ten służy jako ilustracja stabilności mechanicznej kompleksu enzym-substrat pokazanej na przykładzie kompleksu wytworzonego w przykładzie I z żywicy „Amberlite IRC-50” i porównanej ze stabilnością kompleksu wytworzonego w podobny sposób, lecz z innego, nieaktywnego substratu, a mianowicie – z żywicy XAD-7, która jest usieciowanym estrem akrylowym, dostępnym w handlu i wytwarzanym przez firmę Rohm and Haas Corp., Stany Zjednoczone AP.

1,6 g próbki każdego z kompleksów dysperguje się w temperaturze 37°C w 8 litrach 0,2 m roztworu buforu fosforanowego o pH = 7,8 i miesza w ciągu 72 godzin z prędkością 200 obr./min w zaopatrzonej w przegrody kadzi fermentacyjnej New Brunswick Magnaferm. Co 4 godziny pobiera się z każdej kadzi próbkę i oszacowuje wzrokowo ilość uszkodzonych kulek żywicy. Ilość uszkodzonych kulek żywicy XAD-7 jest znacznie większa niż żywicy IRC-50 (ilość uszkodzonych kulek żywicy IRC-50 po 64 godzinach prowadzenia eksperymentu jest

równa ilości uszkodzonych kulek żywicy XAD-7 po 8 godzinach eksperymentu). Uzyskane wyniki wskazują wyraźnie na znacznie większą wytrzymałość mechaniczną żywicy IRC-50.

Przykład XXI. 235 g Amberlite IRC-50 o aktywności 39,4 mikromola/min/g wytworzonego w sposób opisany w przykładzie I, używa się w serii doświadczeń do rozszczepienia 6,25% (wag/obj.) roztworu soli potasowej benzylopenicyliny G. Każde doświadczenie prowadzi się w ciągu 2 1/2 godziny, w temperaturze 37°C i przy pH = 7,8, używając 1 litra roztworu soli potasowej benzylopenicyliny G. Po każdym doświadczeniu Amberlite IRC-50 odsącza się i przemywa wodą destylowaną. Przesącz i popłuczyny zatęża się w obrotowej wyparce próżniowej, miesza z równą objętością ketonu metyloizobutylowego, schładza do temperatury 4–10°C i zakwasza, strącając osad kwasu 6-aminopenicylanowego. Wytrącony osad przemywa się niewielką ilością wody destylowanej, przepłukuje acetonem i suszy w piecu. W przeprowadzonych doświadczeniach średnia wydajność wagowa kwasu 6-aminopenicylanowego wynosiła 91,3%.

Przykład XXII. Adsorpcja enzymu acylazy na polietylenie pokrytym uretanem.

Cząstki polietylenu o małej gęstości (<400 µm) pokrywa się polimerem uretanowym (Urithane 641 W, Cray Valley Products Limited) i pozostawia w ciągu 10 dni do wyschnięcia. Następnie, przemywa się je w ciągu 1 godziny 20% roztworem wodnym acetonu (w % obj), przepłukuje dokładnie wodą destylowaną i poddaje, w ciągu 5 godzin, przy pH w granicach 4,8–9,0, adsorpcji 5 g podwielokrotnościami 125 ml enzymu (54,0 mikromola/min/ml; 3,80 mikromola/min/mg białka). Cząsteczki pokryte uretanem odsącza się, poddaje w ciągu 3 godzin działaniu 75 ml 3,3% (wag/obj) roztworu aldehydu glutarowego i doprowadza do pH = 7,8 sposobem opisanym w przykładzie I.

Pomimo, iż pokryte uretanem, uzyskane cząstki posiadają mniejsze rozmiary niż cząstki IRC-50. Aktywność uzyskanego kompleksu jest 2–3-krotnie mniejsza niż kompleksu z IRC-50.

Aktywność	
pH	mikromole/min/g subst. wilgotnej
4,8	11,3
5,2	14,0
5,6	16,4
6,0	13,2
6,4	13,6
7,0	12,3
7,5	7,8
8,0	10,0
8,5	9,0
9,0	12,2

Przykład XXIII. Adsorpcja enzymu acylazy na nylonie.

Orgolacę (sproszkowany nylon 6 o średnicy cząstek <30 µm, z f-my Ato Chimie Limited, UK) przemywa się w ciągu 1 godziny 65% (wag/obj) roztworem kwasu mrówkowego, a następnie dokładnie przepłukuje wodą destylowaną. 10 g podwielokrotności powyższej substancji poddaje się w ciągu 16 godzin, przy pH w granicach 4,8–9,0, adsorpcji 100 ml enzymu (50,9 mikromola/min/ml; 4,7 mikromola/min/mg białka). Uzyskany kompleks odsącza się, poddaje w ciągu 3 godzin reakcji z 100 ml 3,3% (wag/obj) roztworu aldehydu glutarowego, ponownie odsącza i przemywa w sposób opisany w przykładzie I.

Kompleks o najwyższej aktywności 41,7 mikromola/min/g substancji wilgotnej uzyskany przy pH 4,8 jest porównywalny z typowym kompleksem uzyskiwanym z IRC-50. Jednakże, w tym przypadku występuje duża różnica w rozmiarach cząstek nylonu i IRC50. Przy użyciu IRP-64 (tj. IRC-50 o rozmiarach cząstek stosowanych w farmacji, czyli 0,037–0,149 mm) uzyskuje się z acylazą kompleks o aktywności 478 mikromoli/min/g subst. wilgotnej, tj. o aktywności przeszło jedenastokrotnie większej niż w przypadku użycia jako substratu-nylonu.

Aktywność	
pH	mikromole/min/g subst. wilgotnej
4,8	41,7
5,2	36,1
5,6	26,9
6,0	22,2
6,4	15,7
7,0	17,6

1	2
7,5	17,6
8,0	21,3
8,5	15,7
9,0	9,3

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania kwasu 6-aminopenicylanowego przez reakcję znajdującą się w roztworze wodnym o pH 6,0–9,0 benzylopenicyliny lub fenoksymetylopenicyliny lub ich soli z nierozpuszczalnym w wodzie kompleksem enzym-substrat składającym się z penicylinazy zaadsorbowanej na substracie, który stanowi nierozpuszczalny w wodzie polimer związany poprzecznie czynnikiem sieciującym, takim jak aldehyd glutarowy, glioksal lub aldehyd mrówkowy, z n a m i e n n y t y m, że substratem jest nierozpuszczalny w wodzie polimer lub kopolimer kwasu metakrylowego.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się penicylinazę o czystości w granicach od 1,5 do 30 mikromoli/min/mg/białka.

3. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się substrat o budowie makroporowatej.

4. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że jako substrat stosuje się kopolimer kwasu metakrylowego i dwuwinylobenzenu.

5. Sposób według zastrz. 4, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się kopolimer zawierający dodatkowo grupy benzenosulfonylowe.

6. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się kompleks enzym-substrat w postaci drobnych cząstek o rozmiarach w granicach od 0,1 do 0,01 mm.

7. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że reakcję prowadzi się w temperaturze 30–50°C, utrzymując pH mieszaniny w granicach 7,0–8,5 przez ciągłe lub okresowe dodawanie wodorotlenku sodu.