

37

30



MEMORIA DESCRIPTIVA

correspondiente a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

Solicitante: BRISTOL-MYERS COMPANY

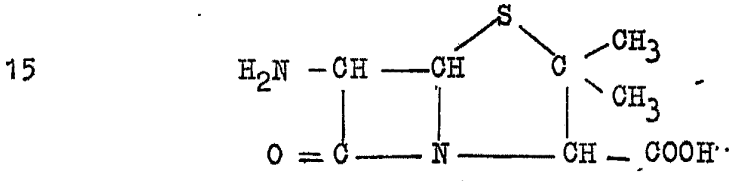
Residencia: Thompson Road, East Syracuse, New York
U.S.A.

Enunciado: "UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE
ENZIMAS"



1 Este invento se refiere a un procedimiento mejorado
para la producción de ácido 6-aminopenicilánico por degra-
dación enzimática de una penicilina. Este invento también
se refiere a un procedimiento mejorado para la producción
5 de una preparación de enzimas capaz de hidrolizar enzimá-
ticamente las penicilinas, particularmente la bencilpeni-
cilina.

En la patente belga nº 569.728 y en la literatura
científica, particularmente en una publicación de Batche-
10 lor et al. en Nature 183, páginas 257-258 (1959), se des-
criben varios procedimientos para la producción y recupe-
ración de ácido 6-aminopenicilánico, que tiene la siguien-
te fórmula estructural:



En tales procedimientos, se cultiva un moho productor de
penicilina en un medio nutritivo y el ácido 6-aminopenici-
20 lánico o una de sus sales se aísla del caldo de fermenta-
ción obtenido. La literatura científica también describe
ciertos procedimientos para la producción de preparacio-
nes de enzimas capaces de degradar enzimáticamente diver-
sas penicilinas para producir ácidos 6-aminopenicilánico
25 y a las que nos referiremos aquí como "amidasa penicilina";



1 ver patentes estadounidenses núms. 3.014.845 y 3.014.846;
Nature 187, 236-238, (1960); J. Am. Chem. Soc., 82, 3790-
3791, (1960). Todos estos procedimientos anteriores dan
5 bencilpenicilina notablemente inferior al rendimiento teó-
rico. Por lo tanto es teóricamente posible, aunque hasta
ahora desconocido, un procedimiento mejorado que dé de he-
cho mayores rendimientos de ácido 6-aminopenicilánico. Un
tal procedimiento es muy interesante para reducir el cos-
10 to de producción de ácido 6-aminopenicilánico que es de
gran importancia en la producción y uso de penicilinas
sintéticas.

Por lo tanto, un objeto del presente invento es pro-
porcionar un procedimiento mejorado para la producción de
15 ácido 6-aminopenicilánico que consiste en la escisión en-
zimática de una penicilina.

Otro objeto de este invento es preparar soluciones
acuosas de amidasa penicilina de mayor eficacia y utilidad.

El procedimiento del presente invento para la produc-
20 ción de ácido 6-aminopenicilánico consiste en fermentar Es-
cherichia coli para producir un caldo de fermentación que
contiene amidasa penicilina, tratar este caldo con un com-
puesto metálico y una sal de amonio cuaternaria de los ti-
pos descritos más adelante, aislar los materiales sólidos
25 del caldo después de este tratamiento, disolver en agua la



1 amidasa penicilina contenida en o sobre tales materiales
sólidos para dar una solución acuosa de amidasa penicili
na, separar los materiales sólidos restantes de la solu-
ción acuosa de amidasa penicilina, poner en contacto la
5 solución acuosa clarificada, resultante de amidasa penici
lina con un agente absorbente tal como carbón activo y
después separar todo el material sólido de dicha solución
acuosa y poner en contacto la solución acuosa resultante
de amidasa penicilina con una penicilina, con lo que és-
10 ta última se hidroliza enzimáticamente para producir áci
do 6-aminopenicilánico.

Un procedimiento preferido del presente invento pa
ra la producción de una solución acuosa de amidasa peni-
cilina de mayor eficacia consiste en tratar un caldo de
15 fermentación que contenga la amidasa penicilina con (1)
un compuesto metálico y (2) una sal de amonio cuaterna-
ria como los descritos más adelante, aislar los materia-
les sólidos del caldo después de dicho tratamiento, disol
ver en agua la amidasa penicilina contenida en o sobre ta
20 les materiales sólidos, separar los materiales sólidos
restantes de la solución acuosa de amidasa penicilina, po
ner en contacto la solución acuosa resultante de amidasa
penicilina con carbón activo y después separar toda la ma
teria sólida no disuelta de dicha solución acuosa.

25 En la preparación de un caldo que contenga la ami-



1 dasa penicilina, pueden utilizarse los procedimientos co-
nocidos en la técnica anterior. Tales procedimientos im-
plican el cultivo de Escherichia coli en un medio nutriti-
vo apropiado. El caldo de fermentación así preparado con-
5 tiene, además de la amidasa, penicilina y el residuo del
medio nutritivo, todos los productos metabólicos del mi-
cro-organismo así como el cultivo vegetativo del micro-
organismo y materiales añadidos al medio nutritivo para fa-
vorecer la producción de amidasa penicilina.

10 De acuerdo con el presente invento, se añade a este
caldo de fermentación un compuesto metálico soluble en
agua del tipo descrito más adelante en cantidades compren-
didas aproximadamente entre 1 y 20 gramos por litro de cal-
do. De preferencia se emplea alrededor de 2 a 5 gramos del
15 compuesto metálico por litro de caldo. También se añade
al caldo una sal de amonio cuaternaria del tipo descrito
más adelante en cantidades comprendidas entre 0,025 % y
0,15 %, aproximadamente, sobre el volumen de caldo origi-
nal (es decir, de 0,25 g a 1,5 g por litro aproximadamen-
20 te del caldo original); de preferencia del 0,05 % al 0,10 %
de dicha sal de amonio cuaternaria sobre el volumen del
caldo original (es decir, alrededor de 0,5 g a 1,0 g por
litro de caldo original). Es conveniente, pero no neces-
ario, añadir al caldo de 2 a 20 ml aproximadamente de to-
25 lueno por litro de caldo; de preferencia, unos 5 a 10 ml



1 por litro de caldo. El compuesto metálico, la sal de amon
nio cuaternaria y el tolueno pueden añadirse separadamen
te al caldo y mezclarse íntimamente con el mismo o bien
se puede mezclar primero el tolueno y la sal de amonio
5 cuaternaria y después añadir la mezcla al caldo y mezclar
con éste. Se prefiere añadir el compuesto metálico al cal
do en primer lugar.

Los compuestos metálicos solubles en agua que puen
den ser utilizados en el procedimiento del presente in-
10 ventionto son los hidróxidos y sales metálicas que contienen
un catión metálico divalente que no destruya o inhiba la
amidasa penicilina y que preferiblemente no ejerza un efec
to perjudicial sobre la penicilina. Por consiguiente, de-
ben evitarse los cationes metálicos como mercurio, hierro
15 y cobre. Un grupo preferido de compuestos metálicos úti-
les en el procedimiento de la presente invención son los
de fórmula MX_2 , donde M es un catión metálico selecciona-
do entre el grupo formado por los cationes calcio, bario
y magnesio y donde X es un anión seleccionado entre el
20 grupo formado por los aniones hidroxilo, cloruro, nitrato,
bromuro, acetato y propionato. El compuesto metálico pre-
ferido es el nitrato cálcico que de preferencia se usa en
una cantidad de alrededor de unos 2,5 gramos por litro
de caldo de fermentación de partida. Estos compuestos me-
25 tálicos, o el catión metálico de los mismos, al parecer

30 NOV



1 hacen que la amidasa penicilina sea recuperable del caldo
junto con los materiales sólidos, pero no impide la subsi
guiente solubilización de dicha amidasa penicilina en
agua.

5 Las sales de amonio cuaternarias útiles en el pro-
cedimiento del presente invento son los cloruros y bromu-
ros de monoalquiltrimetilamonio en los cuales el grupo al
quilo tiene de 12 a 18 átomos de carbono. Las sales de
amonio cuaternarias útiles en el procedimiento del presen
10 te invento son las de fórmula $R-N(CH_3)_3Cl$ y $R-N(CH_3)_3Br$,
donde R es un miembro seleccionado entre el grupo formado
por radicales de hidrocarburos alifáticos que tienen de
12 a 18 átomos de carbono inclusive. Por lo tanto R puede
ser dodecilo, tetradecilo, hexadecilo, octadecilo, octade
15 cenilo y octadecadienilo y mezclas de los mismos.

Las sales de amonio cuaternarias descritas en gene-
ral se encuentran en el mercado; cualquiera de estas sa-
les que no sea comercial puede prepararse siguiendo los
métodos descritos en la literatura técnica. Las sales de
20 amonio cuaternarias y mezclas de las mismas se encuentran
algunas veces mezcladas con agua, isopropanol u otros di-
solventes y una pequeña cantidad de cloruro sódico; tales
mezclas pueden ser utilizadas como fuente de la sal de
amonio cuaternaria deseada. La sal de amonio cuaternaria
25 preferida es el cloruro de hexadeciltrimetilamonio.



1 Tan pronto como sea posible después de haber mezcla
do el compuesto metálico y la sal de amonio cuaternaria,
y en su caso el tolueno, con el caldo, se separan los ma-
teriales sólidos del líquido que sobrenada, por ejemplo
5 por filtración o centrifugación, y se despreja dicho lí-
quido, que ordinariamente contiene menos del 10 % de la
amidasa penicilina originariamente presente en el caldo.
Como la amidasa penicilina se disuelve gradualmente en el
líquido que sobrenada, es conveniente separar rápidamente
10 de aquél los materiales sólidos, con objeto de reducir al
mínimo la pérdida de amidasa penicilina en el líquido que
sobrenada. La porción más importante, generalmente supe-
rior al 90 %, de la amidasa penicilina originariamente
presente en el caldo está contenida en o sobre los mate-
15 riales sólidos separados del líquido que sobrenada.

 La amidasa penicilina recuperada con los materiales
sólidos se disuelve en agua, preferiblemente mezclando di-
chos materiales sólidos con el agua. Hemos encontrado con-
veniente, al realizar la solución de la amidasa penicili-
20 na en esta etapa, utilizar una cantidad de agua compendi-
da entre el 10 % y el 200 % aproximadamente del volumen
original de caldo. El uso de volúmenes de agua menores que
el volumen de caldo conduce a una concentración de la so-
lución de amidasa penicilina. Es preferible volver a sus-
25 pender en un volumen de agua equivalente aproximadamente a



1 1/5-1/2 del volumen original de caldo. Los materiales sólidos se mantienen en contacto con el agua durante el tiempo necesario para que la amidasa penicilina pase a solución.

5 En un procedimiento preferido se agita una suspensión acuosa de los materiales sólidos durante 1 a 24 horas aproximadamente, durante cuyo tiempo la amidasa penicilina contenida en el seno de los materiales sólidos o en su superficie pasa a la solución. En aquellos casos en

10 los que se ha añadido previamente tolueno al caldo, el tiempo necesario para realizar la disolución de la amidasa penicilina es de unas 2 a 4 horas, es decir un tiempo menor del requerido en ausencia de tolueno. Después de

15 efectuada la disolución de la amidasa penicilina, se separan los materiales sólidos de la suspensión acuosa, por ejemplo por filtración o centrifugación. Los materiales sólidos así recogidos se lavan después con agua y se desprecian y las aguas de lavado se añaden al líquido sobrenadante. Es conveniente recoger los materiales sólidos por

20 filtración y lavar el sólido recogido con agua en cantidad calculada para ajustar la concentración de amidasa penicilina a la concentración deseada en el proceso de hidrólisis de la bencilpenicilina. Habitualmente es conveniente llevar el líquido que sobrenada recogido a 1/3

25 aproximadamente del volumen de caldo original.



1 En la etapa siguiente se añade al líquido que sobre
nada que contiene la amidasa penicilina, carbón activo en
cantidad comprendida entre 0,2 y 2,0 gramos aproximadamen
te por litro del caldo de fermentación original; se pre -
5 fiere alrededor de 0,5 a 1,5 gramos aproximadamente de
carbón activo por litro de caldo original y generalmente
se emplea alrededor de 1,0 gramos por litro de caldo ori
ginal. En lugar del carbón activo, pueden emplearse otros
agentes absorbentes tales como silicato de aluminio y mag
10 nesio, tierras alcalinas y otros absorbentes débiles, pe
ro estos otros agentes generalmente son menos eficaces
que el carbón activo. En este punto frecuentemente es con
veniente, aunque no absolutamente necesario, añadir al lí
quido que sobrenada una sal de amonio cuaternaria del ti
15 po descrito anteriormente en cantidad comprendida entre
0,2 y 10 gramos por litro del líquido que sobrenada; se
prefieren de 1 a 3 gramos de sal de amonio cuaternaria por
litro del líquido que sobrenada y habitualmente se utili
zan unos 2 gramos por litro. Es conveniente emplear la
20 sal de amonio cuaternaria en este punto del proceso si la
solución acuosa está enturbiada. A continuación la mezcla
se agita lo suficiente para garantizar una dispersión to
tal del carbón activo y de la sal de amonio cuaternaria
(caso de que se emplee) en el seno del líquido que sobre
25 nada y para permitir que los materiales absorbibles sean



1 absorbidos sobre el carbón activo. A continuación el car-
bón activo y cualquier otra materia sólida contenidos en
el líquido que sobrenada se separan del mismo, por ejemplo
por filtración o centrifugación. El líquido resultante es
5 una solución acuosa prácticamente pura de amidasa penici-
lina que puede ser utilizada en la hidrólisis de bencilpe-
nicilina.

En la etapa de hidrólisis, se añade a la solución
de amidasa penicilina una penicilina natural o biosintéti-
10 ca, preferiblemente bencilpenicilina y la mezcla de reac-
ción de hidrólisis resultante se ajusta a una temperatura
de 20° a 45°C, preferiblemente de 30° a 40°C, y un pH de
6,5 a 9,0, preferiblemente a un pH alrededor de 8, y se
mantiene en tales condiciones alrededor de 1 a 30 horas.
15 Como el pH de la mezcla de reacción tiene tendencia a ba-
jar durante la reacción de hidrólisis, puede ser neces-
ario hacer los ajustes de pH apropiados durante el curso
de dicha reacción de hidrólisis. Las penicilinas que pue-
den ser utilizadas en el procedimiento de esta invención
20 son las penicilinas naturales, por ejemplo penicilina K y
las penicilinas biosintéticas con un grupo α -metileno en
la cadena lateral acílica. Las penicilinas biosintéticas
de mayor utilidad son las producidas añadiendo un precur
sor de penicilina a un caldo de fermentación de penicili-
25 nas. Las penicilinas preferidas son la bencilpenicilina y



1 la fenoximetilpenicilina.

Una vez terminada la hidrólisis enzimática, puede recuperarse el ácido 6-aminopenicilánico del hidrolizado por métodos conocidos. En un método preferido para el
5 aislamiento y recuperación del ácido 6-aminopenicilánico, el hidrolizado se acidula a pH 2 aproximadamente y se filtra y la penicilina que no haya reaccionado y el ácido fenilacético que se separa durante la reacción se separan del filtrado por extracción con un disolvente orgánico,
10 por ejemplo metilisobutilcetona, n-butanol o acetato de butilo, a pH ácido por ejemplo pH 2 a 3. El ácido 6-aminopenicilánico puede ser precipitado entonces en la forma descrita en la patente estadounidense nº 2.941.995 o separado de la solución purificada en la forma descrita en
15 la patente estadounidense nº 3.008.956.

Es conveniente que el caldo de fermentación, después de cosechado, se enfríe a menos de unos 40°C y que todas las soluciones, suspensiones y materiales del proceso se mantengan por debajo de 40°C a través de todas
20 las etapas subsiguientes previas al uso de la amidasa penicilina en los procedimientos de hidrólisis. Es preferible mantener la temperatura de todas las soluciones y materiales del proceso entre 5° y 20°C aproximadamente.

El caldo de fermentación que contiene la amidasa penicilina, en el momento de la cosecha, se encuentra ge-



1 neralmente alrededor de 9. Es conveniente que el caldo,
los materiales sólidos, las suspensiones acuosas de ma-
teriales sólidos y las soluciones acuosas obtenidos del
caldo se mantengan a un pH no inferior a 6 y no superior
5 a 10. En los casos en los que se utiliza en la primera
etapa nitrato cálcico, generalmente no es necesario ajus-
tar el pH. Si el ión metálico utilizado en la primera
etapa se introduce en forma básica, por ejemplo una base
tal como un hidróxido metálico, puede ser necesario aña-
10 dir un agente acidulante, por ejemplo solución acuosa di-
luída de ácido clorhídrico, para rebajar el pH. Inversa-
mente, si dicho ión metálico se introduce en forma ácida,
por ejemplo en forma de sal como cloruro metálico, puede
ser necesario elevar el pH mediante la adición al caldo
15 de una base, por ejemplo solución acuosa diluída de hi-
dróxido sódico.

La adición de tolueno al caldo completo en la eta-
pa en la que se añade nitrato cálcico al caldo completo
sirve para reducir el tiempo necesario para disolver la
20 amidasa penicilina de la torta. Aunque es conveniente utili-
zar alrededor de 2 a 20 ml de tolueno por litro de caldo
en esta etapa como se ha indicado anteriormente, puede
utilizarse más tolueno pero no cumple ningún propósito
útil.

25 Los siguientes ejemplos ilustrarán esta invención



1 sin que esté limitada a los mismos.

EJEMPLO 1

Se fermenta Escherichia coli en condiciones aeróbicas, sumergido, para producir 71,5 galones (aproximadamente 271
5 litros) de caldo de fermentación completo conteniendo 2500 unidades de amidasa penicilina por ml. Una "unidad de amidasa penicilina" es la cantidad de amidasa penicilina que produce 1 mcg de ácido 6-aminopenicilánico en 3 horas a
35°C, por hidrólisis de bencilpenicilina potásica en solu-
10 ción acuosa que contiene el 3 % en peso de esta última. So-
bre este caldo completo se añaden 3369 ml de una solución acuosa al 25 % de nitrato cálcico (contiene 3,4 libras de nitrato cálcico por galón, 390 g/litro), 280 g de o-bencil-
p-clorofenol, 280 g de bromuro de cetiltrimetilamonio
15 (0,967 g por litro de caldo; alrededor del 0,1 % en volu-
men del caldo) y 946 ml de tolueno. El caldo con los mate-
riales añadidos se agita durante 15 minutos, se filtra y los materiales sólidos se lavan con 75 litros de agua. La
torta sólida húmeda recogida pesa 9988 g y da por análisis
20 alrededor del 54 % de agua.

EJEMPLO 2

Una porción de 100 g de la torta húmeda obtenida en la forma descrita en el anterior Ejemplo 1 se suspende en 200 ml de una solución tampón de fosfato potásico al 2 %
25 a pH 7,5. Sobre esta suspensión se añaden 6 g de bencil-



1 penicilina potásica. La mezcla resultante se agita durante
17 horas a 35°C, se filtra y se lava con agua hasta que el
filtrado asciende a 630 ml. Se determina el contenido de
ácido 6-aminopenicilánico en el filtrado y se encuentra que
5 el rendimiento real de ácido 6-aminopenicilánico a partir
de bencilpenicilina potásica es alrededor del 67 % del ren-
dimiento teórico.

EJEMPLO 3

Una porción de 3,455 kg de la torta húmeda obtenida
10 por el procedimiento del Ejemplo 1 se suspende en agua
(unos 3,8 litros) durante 24 horas y después se filtra.

Parte A: Sobre una porción de 500 ml del filtrado se
añaden 15 g de bencilpenicilina potásica y la mezcla resul-
tante se agita durante 6 horas a 35°C y a un pH comprendi-
15 do entre 7,5 y 8,5, manteniendo este valor del pH mediante
la adición intermitente de solución acuosa al 10 % de hidró-
xido sódico. Al cabo de este período de 6 horas de hidrólisis,
se mide el contenido de ácido 6-aminopenicilánico en
la mezcla de reacción de hidrólisis y se determina que el
20 rendimiento de ácido 6-aminopenicilánico a partir de penici-
lina G es el 74 % del rendimiento teórico.

Parte B: Sobre una segunda porción de 500 ml del fil-
trado se añaden 5 g de carbón activo (Darco KB) y la mezcla
resultante se agita durante 15 minutos y después se filtra.
25 Sobre una porción de 200 ml del filtrado incoloro resultan-



1 te se añaden 6 g de bencilpenicilina potásica para formar
 una mezcla de reacción de hidrólisis que entonces se mantie
 ne a un pH comprendido entre 7,5 y 8,0 durante 6 horas a
 35°C, manteniendo el pH mediante la adición intermitente a
 5 la mezcla de reacción de solución acuosa al 10 % de hidró-
 xido sódico. Al cabo de este período de 6 horas de hidróli-
 sis se mide el contenido de ácido 6-aminopenicilánico en la
 mezcla de reacción de hidrólisis y se determina que el ren
 dimiento de ácido 6-aminopenicilánico a partir de penicili-
 10 na G es el 90 % del rendimiento teórico.

Parte C: Se repite el procedimiento de la Parte B uti
 lizando 4 g de bencilpenicilina potásica en lugar de 6 g.
 El rendimiento de ácido 6-aminopenicilánico a partir de pe-
 nicilina G potásica es el 90 % del rendimiento teórico.

15 EJEMPLO 4

Se prepara un caldo de fermentación fermentando Esche-
richia coli en condiciones aeróbicas, sumergido, siguiendo
 los procedimientos habituales y se halla que contiene 5270
 unidades de amidasa penicilina por ml. Los siguientes expe
 20 rimentos muestran los efectos del uso de diversas cantida-
 des de sal de amonio cuaternaria:

Parte A: Una solución de 2,5 g de nitrato cálcico di-
 hidrato en 6 ml de agua se añade a 1 litro del mencionado
 caldo de fermentación. Después de mezclar, se filtra el cal
 25 do y la torta filtrada se lava con 150 ml de agua. A conti-



1 nuación se suspende la torta filtrada en 200 ml de agua a
la que se añaden 5 ml de tolueno y la suspensión se agi-
ta durante 3 horas. Después de agitar, se filtra la suspen-
sión y los materiales sólidos recogidos se lavan con 100
5 ml de agua. El filtrado se agita con 1 g de carbón activo
(Darco KB) y 1,2 ml de "Mezcla de Sales Amónicas Cuaterna-
rias n^o I" ("Quaternary Ammonium Salt Mixture No. I"). La
"Mezcla de Sales Amónicas Cuaternarias n^o I" es un produc-
to comercial de Armour & Company de Chicago, Illinois,
10 que se vende bajo el nombre comercial de "Arquad 16-50" y
es una mezcla líquida de sales de amonio cuaternarias que
contiene, en peso, alrededor del 45 % de cloruro de hexa-
deciltrimetilamonio, 3 % de cloruro de octadeciltrimetil-
amonio, 2 % de cloruro de octadeceniltrimetilamonio, 35 %
15 de isopropanol, 14 % de agua y 1 % de cloruro sódico apro-
ximadamente.

Después de mezclar a fondo, toda la materia sólida se
separa de la mezcla por filtración y se obtienen 280 ml de
una solución acuosa prácticamente pura de amidasa penicili-
20 na que contiene 1950 unidades de amidasa penicilina por ml
y alrededor del 10 % de la amidasa penicilina originaria-
mente presente en el caldo.

Parte B: Sobre una porción de 1 litro de este caldo
de fermentación se añade una solución de 2,5 g de nitrato
25 cálcico dihidrato en 6 ml de agua y 3 ml de una solución



1 que contiene 10 ml de tolueno y 4 ml de Mezcla de Sales
Amónicas Cuaternarias nº I. Después de mezclar se filtra
el caldo y la torta filtrada se lava con 150 ml de agua.
A continuación se suspende la torta filtrada en 200 ml de
5 agua a la que se añaden 5 ml de tolueno y la suspensión
se agita durante 3 horas. Después de haber agitado, se fil-
tra la suspensión y los materiales sólidos recogidos se
lavan con 100 ml de agua. El filtrado se agita con 1 g de
carbón activo (Darco KB) y 1,2 ml de Mezcla de Sales Amó-
10 nicas Cuaternarias nº I.

Después de mezclar a fondo, se separa toda la mate-
ria sólida de la mezcla por filtración y se obtienen 350
ml de una solución acuosa prácticamente pura de amidasa pe-
nicilina que contiene 9590 unidades de amidasa penicilina
15 por ml y alrededor del 64 % de la amidasa penicilina origi-
nariamente presente en el caldo.

Parte C: Se repite el procedimiento de la Parte B
utilizando 9 ml en lugar de 3 ml de la solución de tolue-
no y sal de amonio cuaternaria; los 9 ml contienen alrede-
20 dor de 1,3 g de sal amónica cuaternaria. El proceso da lu-
gar a 300 ml de una solución acuosa prácticamente pura de
amidasa penicilina que contiene 500 unidades de amidasa pe-
nicilina por ml o alrededor del 2,9 % de la amidasa peni-
cilina presente en el litro de caldo de fermentación ori-
25 ginal.



1 Parte D: Se repite el procedimiento de la Parte B
utilizando 6 ml en lugar de 3 ml de la solución de tolueno y sal de amonio cuaternaria. El proceso da lugar a
298 ml de una solución acuosa prácticamente pura de amidasa
5 penicilina que contiene 10.470 unidades de amidasa
penicilina por ml o alrededor del 59 % de la amidasa penicilina presente en el litro de caldo de fermentación original.

Parte E: Se repite el procedimiento de la Parte B
10 utilizando 7 ml en lugar de 3 ml de la solución de tolueno y sal de amonio cuaternaria. El proceso da lugar a
318 ml de una solución acuosa prácticamente pura de amidasa penicilina que contiene 9900 unidades de amidasa penicilina por ml o alrededor de 59,7 % de la amidasa penicilina presente en el litro de caldo de fermentación original.
15 penicilina presente en el litro de caldo de fermentación original.

Parte F: Se repite el procedimiento de la Parte B
utilizando 7 ml en lugar de 3 ml de la solución de tolueno y sal de amonio cuaternaria que se añade a la suspensión
20 acuosa de la torta completa en lugar de añadirse al caldo antes de la etapa de filtración en la que se obtiene la torta a partir del caldo de fermentación. El proceso da lugar a 310 ml de una solución acuosa prácticamente pura de amidasa penicilina que contiene 5390 unidades de amidasa
25 penicilina por ml, que es alrededor del 32 % de la amidasa



1 penicilina presente en el litro de caldo de fermentación original.

EJEMPLO 5

5 Se prepara un caldo de fermentación fermentando Escherichia coli en condiciones aeróbicas, sumergido, siguiendo los procedimientos habituales y se halla que contiene 6690 unidades de amidasa penicilina por ml.

10 Parte A: Sobre una porción de 1 litro de este caldo de fermentación se añade una solución de 2,5 g de nitrato cálcico dihidrato en 6 ml de agua y 2 ml de Mezcla de Sales Amónicas Cuaternarias nº I. Después de mezclar, se filtra el caldo y la torta filtrada se lava con 150 ml de agua. A continuación se suspende la torta filtrada, con agitación, en 250 ml de agua durante 3 horas. Después se
15 filtra la suspensión y la torta filtrada se lava con 200 ml de agua. El filtrado se agita a continuación con 1 g de carbón activo (Darco KB) y 1,8 ml de Mezcla de Sales Amónicas Cuaternarias nº I. Después de mezclar a fondo, toda la materia sólida se separa de la mezcla por filtra-
20 ción y se obtienen 440 ml de una solución acuosa prácticamente pura de amidasa penicilina que contiene 2940 unidades de amidasa penicilina por ml, que es alrededor del 19 % de la amidasa penicilina presente en el litro de caldo de fermentación original.

25 Parte B: Se repite el procedimiento de la Parte A

30 NOV 1961

1 con la diferencia de que se añaden 5 ml de tolueno al cal
do completo en el momento de la adición del nitrato cálcico
co dihidrato. El proceso da lugar a 430 ml de una solución
acuosa prácticamente pura de amidasa penicilina que con-
5 tiene 6730 unidades de amidasa penicilina por ml, que es
alrededor del 43 % de la amidasa penicilina presente en
el litro de caldo de fermentación original.

Parte C: Se repite el procedimiento de la Parte B
con la diferencia de que se omiten los 2 ml de Mezcla de
10 Sales Amónicas Cuaternarias nº I. El proceso da lugar a
400 ml de una solución acuosa prácticamente pura de amida
sa penicilina que contiene 1610 unidades de amidasa peni-
cilina por ml, que es alrededor del 10 % de la amidasa pe
nicilina presente en el litro de caldo de fermentación
15 original.

Parte D: Se repite el procedimiento de la Parte B
con la diferencia de que los 2 ml de Mezcla de Sales Amó-
nicas Cuaternarias nº I se sustituyen por 2 ml de una mez
cla de sales amónicas cuaternarias que contiene, en peso,
20 alrededor de 4 % de cloruro de octiltrimetilamonio, 4,5 %
de cloruro de deciltrimetilamonio, 23,5 % de cloruro de
dodeciltrimetilamonio, 9 % de cloruro de tetradeciltrime-
tilamonio, 4 % de cloruro de hexadeciltrimetilamonio, 2,5 %
de cloruro de octadeciltrimetilamonio, 2,5 % de cloruro de
25 octadeceniltrimetilamonio, 1 % de cloruro sódico, 36 % de



1 isopropanol y 13,5 % de agua. El proceso da lugar a 320
ml de una solución acuosa prácticamente pura de amidasa
penicilina que contiene 6370 unidades de amidasa penici-
lina por ml, que es alrededor del 31 % de la amidasa pe-
5 nicilina presente en el litro de caldo de fermentación
original.

EJEMPLO 6

Una porción de 6,91 kg de la torta húmeda obtenida
en la forma descrita previamente en el Ejemplo 1 se sus-
10 pende en agua (alrededor de 7,5 litros) durante 24 horas,
con agitación, y después se filtra. Una porción de 3784
ml del filtrado se mezcla con el 1 % de carbón activo so-
bre el peso del filtrado y se filtra. Sobre 1348 ml del
filtrado (obtenido después del tratamiento con carbón) se
15 añaden 1,9 g de o-bencil-p-clorofenol y 56,8 g de bencil-
penicilina potásica en 546 ml de agua. La mezcla de reac-
ción se agita durante 17 horas a 95°F (35°C) y pH 8, man-
teniendo el pH en este valor mediante la adición de solu-
ción acuosa de hidróxido sódico cuando sea necesario. Al
20 cabo del período de reacción de 17 horas, la mezcla de
reacción contiene 14.920 mcg/ml de ácido 6-aminopenicilá-
nico (86 % del rendimiento teórico) y 5300 unidades Oxford
por ml de bencilpenicilina (11 % de la penicilina total
añadida a la mezcla de reacción); se toma una muestra de
25 la mezcla de reacción para ser utilizada en la forma des-



1 crita en la Parte B y se prosigue la reacción durante 4
horas más. Al cabo de este período de reacción de 21 ho
ras, la mezcla de reacción contiene 15.590 mcg/ml de
ácido 6-aminopenicilánico (89,6 % del rendimiento teóri-
5 co) y 3270 unidades Oxford de bencilpenicilina (6,8 % de
la penicilina total añadida a la mezcla de reacción).
Una porción de 200 ml del medio que ha reaccionado duran
te 21 horas se ajusta a pH 2 con ácido sulfúrico, se ex-
trae con metilisobutilcetona y se ajusta a pH 4 con solu-
10 ción acuosa al 10 % de hidróxido sódico. Se cristaliza el
ácido 6-aminopenicilánico a lo largo de un período de 4
horas y después se recoge por filtración, se seca y se
halla que pesa 2,05 g. El procedimiento da lugar a un ren-
dimiento de ácido 6-aminopenicilánico igual al 59 % del
15 rendimiento teórico de bencilpenicilina a ácido 6-amino-
penicilánico.

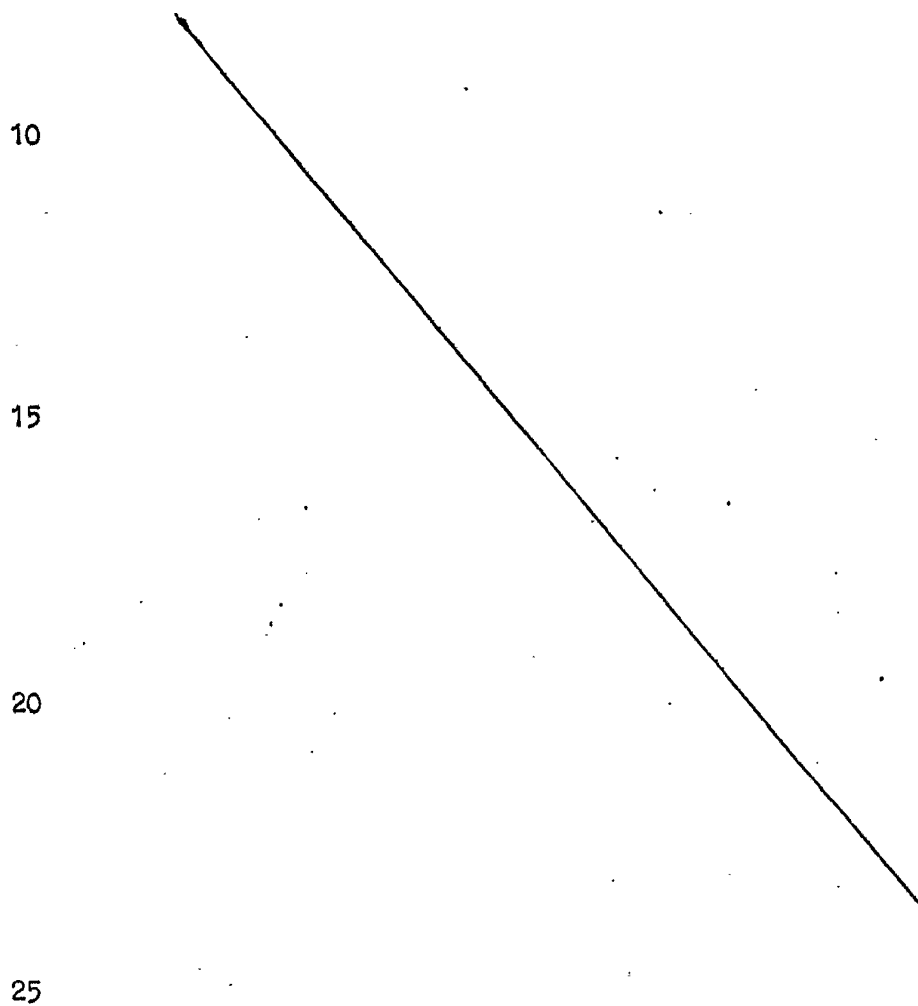
Parte B: Una porción de 500 ml de la mezcla acuosa
de reacción tomada después de 17 horas de hidrólisis, co-
mo se ha descrito en la Parte A, se ajusta a pH 2 con solu-
20 ción acuosa de ácido sulfúrico y se extrae con metilisobu-
tilcetona. Después de esta extracción, la capa acuosa se
ajusta a pH 7 y se concentra a vacío hasta 100 ml. Los
100 ml de concentrado se ajustan a pH 4 con ácido clorhí-
drico 4 N y el ácido 6-aminopenicilánico cristaliza a lo
25 largo de un período de 4 horas a pH 4. El ácido 6-amino-

30 NOV 1952



1 penicilánico se recoge por filtración, se seca y se halla que pesa 6,30 g y contiene 980 mcg/mg. El procedimiento da lugar a un rendimiento de ácido 6-aminopenicilánico igual al 71 % del rendimiento teórico.

5 En resumen, la Patente de Invención que se solicita recaerá sobre las siguientes:



30 NOV 1954



1 cual el compuesto metálico citado tiene la fórmula MX_2 ,
donde M es un catión seleccionado entre los cationes
calcio, bario y magnesio y donde X es un anión seleccio-
nado entre los aniones hidroxilo, cloruro, nitrato, bro-
5 muro, acetato y propionato; en cuyo procedimiento la sal
de amonio cuaternaria citada está seleccionada entre
 $R-N(CH_3)_3Cl$ y $R-N(CH_3)_3Br$, donde R es un radical de hi-
drocarburo alifático de 12 a 18 átomos de carbono inclu-
sive y en el cual el adsorbente sólido citado es carbón
10 activo.

3. Un procedimiento según la Reivindicación 2 en
el cual se mezcla tolueno con el caldo de fermentación,
el compuesto metálico y la sal de amonio cuaternaria ci-
tados.

15 4. Un procedimiento según la Reivindicación 3 en
el cual se mezcla con el carbón activo y el líquido que
sobrenada citados una sal de amonio cuaternaria seleccio-
nada entre $R-N(CH_3)_3Cl$ y $R-N(CH_3)_3Br$, donde R es un radi-
cal de hidrocarburo alifático de 12 a 18 átomos de carbo-
20 no inclusive.

5. Un procedimiento según la Reivindicación 4 en
el cual se añaden de 1 a 20 gramos del compuesto metáli-
co citado, de 0,25 a 1,5 gramos de la sal de amonio cua-
ternaria citada y de 2 a 20 ml de tolueno por litro del
25 mencionado caldo de fermentación; y en el cual se añaden



1 al líquido que sobrenada citado de 0,2 a 2 gramos del car
bón activo citado por litro de dicho caldo de fermentación
y de 0,2 a 10 gramos de la sal de amonio cuaternaria men-
cionada por litro de dicho líquido que sobrenada.

5 6. Un procedimiento, según la Reivindicación 5 en
el cual el citado caldo de fermentación que contiene ami-
dasa penicilina se prepara desarrollando un cultivo de Es-
cherichia coli.

7. Un procedimiento según la Reivindicación 6 que
10 incluye la etapa adicional de añadir bencilpenicilina a la
mencionada solución acuosa purificada de amidasa penicili-
na y mantener la mezcla acuosa resultante a una temperatu-
ra comprendida entre 20°C y 45°C y un pH de 6,5 a 9, duran-
te un período de 1 a 30 horas, con lo cual la bencilpenici-
15 lina citada se hidroliza enzimáticamente a ácido 6-amino-
penicilánico.

8. Se reivindica por último como objeto sobre el
que ha de recaer la Patente de Invención que se solicita:
"UN PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCION DE ENZIMAS".

20 Todo conforme queda descrito y reivindicado en la
presente Memoria descriptiva que consta de veintisiete pá-
ginas mecanografiadas.

Madrid, 30 Noviembre, 1966

BERNARDO UNGRIA

P.P.

25