

407600

13 OCT 1972



PATENTE DE INVENCION

=====
Ref: Le A 13 991-Sp.

Memoria Descriptiva

sobre:

Procedimiento para la obtención de penicilinacilasa
cristalina pura.

=====

Solicitante BAYER AKTIENGESELLSCHAFT, entidad alemana, residente
en Leverkusen-Bayerwerk, República Federal Alemana.

F. E. 14-5-75

Int. Cl. 2. 6096

El presente invento se refiere a un procedi-
miento para la obtención de la enzima cristalina pura
penicilinacilasa de *Escherichia coli*.

La penicilinacilasa (penicilinamidasa, penici-
5. linaeacilasa) [EC (Enzyme Commission) 3.5.1.11] es

- 2 407600



5. una enzima conocida desde hace mucho tiempo [K. Sakaguchi y S. Murao, J. agr. Chem. Soc., Japan, 23, 411 (1950)] que hidroliza la ligadura de amida en la posición 6 de bencilpenicilina bajo formación de ácido 6-aminopenicilánico (6 APS) y de ácido fenilacético. La existencia de esta enzima fué comprobada en gran número de bacterias y de hongos [J.M.T. Hamilton - Miller, Bact. Rev. 30, 761 (1966)]. La penicilinacilasa obtenida a partir de E. coli tiene una amplia especificidad; además de bencilpenicilina, es hidrolizado un gran número
10. de otras penicilinas, por ejemplo penicilina X y ampicilina, así como numerosas amidas del ácido fenilacético alifática o aromáticamente sustituidas en el nitrógeno de amida y sus derivados sustituidos en el átomo de carbono α o en el núcleo de benceno [M. Cole, Biochem. J. 115, 733 (1969); W. Kaufmann y K. Bauer, Nature 203, 520 (1964)].
- 15.

- El efecto de la enzima es mundialmente utilizado a gran escala industrial para la producción de 6 APS a partir de bencilpenicilina. La realización técnica de ese procedimiento procedió hasta ahora por aplicación de las células enteras conteniendo la enzima (Patente alemana No. 1.111.778) o de una enzima extraída de la célula, pero no purificada ulteriormente (Patente norte-americana No. 3.297.546) o de la enzima no purificada adsorbida sobre bentonita (Patente norte-americana No. 3.446.705). En la última cita, los ejemplos
20. describen el procedimiento tan solo para la penicilinacilasa a partir del Bacillus megaterium y del Streptomyces, de modo que de esa literatura no pueden obtenerse ningunos datos para la enzima a partir de E. Coli.
- 25.

- Si bien es conocida la adsorción de proteínas y enzimas sobre bentonita (Methods in Enzymology, Tomo I, 96), sin
- 30.



embargo, hasta ahora tan solo en los casos mas raros se logró volver a obtener por elución con buen rendimiento y de elevada pureza una enzima ligada por adsorción.

5. El empleo de células enteras o de la enzima extraída, pero no purificada, por otra parte, tiene diversas desventajas. Tal desventaja es particularmente la descomposición de una parte de la penicilina aplicada por la acción de otras enzimas contenidas en los preparados en bruto, particularmente de la β -lactamasa de penicilina, y causado por ella un menor rendimiento en 6APS. Otra desventaja importante reside en una contaminación del 6 APS por proteínas, la cual es capaz de conducir a reacciones alérgicas en la administración al hombre de las penicilinas sintéticas preparadas a partir de este 6 APS.
10. Estas impurezas pueden ser eliminadas del 6 APS tan solo por etapas de purificación costosas y producentes de pérdidas.
- 15.

Las citadas desventajas de la utilización de células enteras o de una enzima en bruto exenta de células, son evitadas por la aplicación de un preparado de penicilinacilasa pura. Hasta ahora sin embargo, no se tenía a disposición un procedimiento sencillo técnicamente realizable para la preparación de la enzima pura.

20.

- La purificación parcial de la penicilinacilasa en pequeñas cantidades ya fué descrita varias veces [P.S. Borkar et al, Hindustan Antibiotics Bull. 4, 152 (1961); A. Szentirmai, Acta Microbiologica Acad. Sci. Hung. 12, 395 (1966); D.A. Self et al. Biotechnology and Bioengineering 11, 337 (1969)]. Esos procedimientos se extienden sobre varias etapas de precipitación, de adsorción o de cromatografía y dan menores rendimientos solamente. Una purificación parcial a mayor escala por precipitación con tanino y la purificación con diversos agentes
- 25.
- 30.



intercambiadores de iones fueron descritos además en la Patente alemana publicada no examinada No. 1.907.365. Un preparado de acilasa específico como electroforéticamente homogéneo, fué obtenido por Bondareva et al. [Biochemistry (Rusia) 34, 76 (1969)] a una escala de laboratorio, por precipitación con sulfato de amonio, por cromatografía sobre CM-celulosa y por cromatografía sobre DEAE-celulosa, con un rendimiento al 27 %. La cristalización de la penicilinacilasa aún no fué descrita. Esos procedimientos conocidos ya sea dan una enzima tan solo parcialmente purificada o sea son complicados y producentes de pérdidas.

Por ésto, existía la necesidad de un procedimiento sencillo para la producción de una penicilinacilasa pura.

Además, era digno de esfuerzos lograr la cristalización, en vista de que, por un lado, es un criterio de pureza y, por otro lado, la suspensión de cristales representa una forma estable de almacenamiento y de transporte de la enzima.

La presente invención, provee un procedimiento que permite obtener en forma sencilla la penicilinacilasa a partir de E.Coli y cristalizar la misma. Por la etapa de adsorción-elución con bentonita se consigue una fuerte reducción del volumen que permite una realización del procedimiento según la invención a una escala técnica.

La actividad de la penicilinacilasa producida según el invento, es determinada por un novedoso ensayo colorimétrico que aprovecha la amplia especificidad de la enzima (E.Rauenbusch. Publicación en preparación). De substrato sirve el ácido 6-nitro-3-(N-fenil-acetil)-amino-benzoico (NIPAB). La medición procede en solución 0,002-molar, pH 7,5, 25°C a 405 mm. El coeficiente molar de extinción del ácido 6-nitro-3-amino-



- benzoico originado en la reacción asciende a $9090 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Una unidad enzimática (E) desdobra $1 \mu \text{ mol}$ del sustrato por minuto. El desdoblamiento de bencilpenicilina bajo iguales condiciones es aproximadamente 1,5 veces más rápido.
5. Las actividades específicas están calculadas sobre proteína determinada según el método de biuret.
- Según el procedimiento de acuerdo con la invención se parte de un extracto en bruto de células de E.Coli. Este extracto es obtenido por ejemplo de un cultivo de células de E.Coli, preparado según la Patente alemana No. 1.111.778, o preferiblemente de la Mutante E.Coli ATCC 21728, descrita en la Patente alemana Acta No. P 21 54 213.2, por tratamiento con 3 % de metilisobutilcetona a pH de 7-8 o por desintegración mecánica siendo la penicilinacilasa puesta en solución hasta 70 a 90 %.
- 10.
- 15.
- De acuerdo con el procedimiento de la invención para una precipitación más fácil de los fragmentos de las células y para una purificación simultánea de la penicilinacilasa por precipitación de proteína inactiva y de otras sustancias acompañantes, mediante la adición de un ácido mineral, por ejemplo HCl, HNO₃, H₂SO₄, H₃PO₄, o de otro ácido fuerte, por ejemplo ácido acético, es llevado a un valor pH de 3,5 a 5,5, preferiblemente de 5,0, y el material precipitado es separado en forma usual por centrifugación o filtración y es desechado.
- 20.
- 25.
- De la solución clara obtenida como capa superpuesta, la penicilinacilasa es ligada por adsorción, mediante la adición de un mineral de silicato de aluminio, de preferencia, del tipo de montmorillonita, preferiblemente de bentonita; el mineral es separado en forma usual por filtración o centrifugación y la penicilinacilasa es aislada del residuo por elu-
- 30.

407600

- 6 -



ción con una solución de sal apropiada.

5. La adsorción de la penicilinaclilasa sobre el mineral puede proceder a una conductibilidad específica de la solución de 0 a 5 m/S y a un valor pH de 3,5 a 8,0. En la realización preferida del procedimiento según la invención, se observa una conductibilidad de 1 a 4 m/S y un valor pH de 5,0. El ajuste de la solución de la enzima a la conductibilidad deseada, puede ser efectuado por dilución, por desalación con intercambiadores de iones de hecho mixto o por otros procedimientos usuales de desalar. El mejor rendimiento y enriquecimiento en la subsiguiente elución es logrado, si se agrega justamente tanta bentonita que sea necesaria para la adsorción al 100 % de la enzima, lo que se verifica por medición de la actividad en una muestra de la capa superior.
10. Bajo las condiciones preferidas, lo son aproximadamente 2,0 a 5,0 g de bentonita por gramo de proteína disuelta. Una purificación todavía mejor es lograda, si se efectúa una adsorción fraccionada, agregándose primeramente alrededor de una quinta parte de la cantidad total de bentonita, con lo que es adsorbida casi exclusivamente proteína extraña inactiva. Después de la separación de la bentonita primeramente agregada, entonces por adición de la cantidad restante es adsorbida la penicilinaclilasa. Para la elución de la penicilinaclilasa adsorbida, se emplean soluciones acuosas 0,1 a 1,0-molares de sales inorgánicas u orgánicas, por ejemplo fosfato, sulfato, acetato, a un valor pH de 6,0 a 9,0.
15. Preferiblemente se emplean soluciones 0,1 - 1,0-molares de acetato de sodio o de potasio a un valor pH de 8,5, en vista de que así, en comparación con sales de aniones bi- o trivalentes, se separa por elución preferiblemente penicilinga
- 20.
- 25.
- 30.

Preferiblemente se emplean soluciones 0,1 - 1,0-molares de acetato de sodio o de potasio a un valor pH de 8,5, en vista de que así, en comparación con sales de aniones bi- o trivalentes, se separa por elución preferiblemente penicilinga



5. cilasa. En total, por la adsorción sobre bentonita y por la elución de la enzima, se consigue un enriquecimiento 4 a 6 veces mayor con un rendimiento a aproximadamente un 70 % a un 90 %. Las ventajas especiales de esta etapa de purificación residen en la sencillez de su realización también a una escala técnica, en la reducción de volumen de la solución conteniendo la enzima hasta una décima parte del extracto en bruto y en la obtención de una solución concentrada de la enzima enriquecida que facilita esencialmente la elaboración ulterior.
10. La purificación ulterior de la penicilinacilasa hasta la proteína de enzima pura, según el procedimiento de la invención, es efectuada por cromatografía sobre intercambiadores macroporosos apropiados y por subsiguiente cristalización, pudiendo obtenerse por tratamiento conya sea un intercambiador de aniones o sea un intercambiador de cationes, una solución de la enzima parcialmente purificada, de la cual puede cristalizarse la enzima pura por adición de una sal precipitada. O bien se obtiene, en dos etapas por tratamiento con un intercambiador de cationes y con un intercambiador de aniones en sucesión arbitraria, una solución de la enzima homogénea pura, de la cual entonces puede cristalizarse también la enzima.
15. Como intercambiadores de aniones son apropiados particularmente celulosas sustituidas con grupos básicos, por ejemplo aminoetilcelulosa, dietilaminoetilcelulosa (DEAE-celulosa), trietilaminoetilcelulosa (TEAE-celulosa) y correspondientes dextranas transversalmente reticuladas, por ejemplo DEAE-Sephadex y QAE-Sephadex ("Sephadex" es marca registrada de la Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala). La purificación sobre
20. estos intercambiadores de aniones puede proceder a un valor
- 25.
- 30.



pH de 6,5-9,0. De preferencia, se realiza el procedimiento con el intercambiador en forma de una columna. La enzima es adsorbida desde una solución diluida de sal y es separada por elución mediante la reducción del valor pH o mediante el aumento de la concentración de sal en la sustancia amortiguadora de elución. La actividad de penicilinacilasa, por regla general, está contenida en la primera cumbre de proteína eluida de la columna. De preferencia, la elución procede con un gradiente de concentración de fosfato de potasio 0,01 a 0,1 molar, pH = 7,0. El rendimiento en esta etapa de purificación es de 80 a 90 %.

Como intercambiadores de cationes se prestan particularmente bien celulosas sustituidas con grupos ácidos, por ejemplo, sulfoetilcelulosa, fosfocelulosa, carboximetilcelulosa, dextranas transversalmente reticuladas, por ejemplo Se-Sephadex, SP-Sephadex, CM-Sephadex ("Sephadex" es marca registrada de la Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala) y geles de acrilamida, por ejemplo CM-Bio-Gel ("Biogel" es marca registrada de Bio-Rad Laboratories) y geles de poliacrilamida conteniendo grupos carboxilo, preparados según Biochemistry 8 4074 (1969) e intercambiadores de iones de resinas macroporosas, por ejemplo Lewatit SP-100, SP-120, CNP ("Lewatit" es marca registrada de Farbenfabriken Bayer A.G.).

La adsorción de la penicilinacilasa sobre los intercambiadores de cationes procede desde una solución de sal 0,01 a 0,1 molar a un valor pH de 3,5 a 6,0, preferiblemente al valor pH de 5,0, ya sea por adición del intercambiador a la solución de la enzima o por hacer pasar la solución de enzima sobre una columna cargada con el intercambiador. La elución procede ya sea a un valor pH elevado de 6,0 a 8,5 o preferi-



- blemente, a un valor pH constante, por un aumento progresivo de la concentración de sal o bien en forma de un gradiente lineal. La realización preferida del procedimiento según la invención para la preparación de la penicilinacilasa pura, es
5. la elución a un valor pH de 5,0 por un gradiente de acetato de sodio o de potasio 0,05 a 0,5 molar. La elución procede bajo estas condiciones como zona aguda a aproximadamente 0,2 moles de acetato de sodio con un rendimiento al 80-90 %.
- De las soluciones de la penicilinacilasa altamente enriquecida, obtenidas por la aplicación de intercambiadores de aniones solos o en combinación con un intercambiador de cationes, la enzima es llevada a la cristalización por precipitación con una sal apropiada, preferiblemente sulfato de amonio. La adición de la sal puede hacerse como solución concentrada
10. o en forma sólida. Soluciones muy diluidas de la enzima convenientemente son concentradas previamente según procedimientos conocidos, por ejemplo mediante filtración por una membrana o mediante precipitación con sulfato de amonio hasta una saturación al 70 % y redisolución del precipitado en un volumen mas pequeño. La cristalización procede, según la concentración de proteína, desde una solución de sulfato de amonio saturada al 45-55 %, preferiblemente a un valor pH de 6,0 a
15. 7,0 y a la temperatura ambiente dentro de unos días. Los cristales formados rápidamente tienen, bajo el microscopio, la forma de agujas partidas. En el caso de una cristalización lenta, se obtienen tablitas muy regulares (Figura 1: Reproducción de una fotografía con ampliación a 200 veces su tamaño). La solución de la enzima cristalizada muestra en la
20. electroforesis de disco (7 % de gel, pH 8,9) tan solo una banda aguda nítida (Figura 2).
- 25.
- 30.

- 10407600



La penicilinacilasa cristalina pura está caracterizada por las siguientes propiedades:

Especificidad: Desdoblamiento de bencilpenicilina, N-fenacetil-L-asparagina, ácido 6-nitro-3 (N-fenacetil)aminobenzoico y otras amidas del ácido fenilacético.

5.

Peso molecular: 71000 ± 2000 , obtenido del equilibrio de sedimentación con un volumen específico parcial de $\bar{v} = 0,665 \text{ ml/g}$

70000 ± 5000 , obtenido de la filtración por gel de capa delgada.

10.

Coefficiente de sedimentación: $S_{20,w}^0 = 2,56 \pm 0,035$ a un pH de 7,4, espectro UV (Figura 3); en amortiguador de fosfato a un pH de 7,0 (A) y en NaOH 0,1-normal (B);

espectro CD: pH = 4-10 (Figura 4) condiciones: $< 250 \text{ nm}$; $0,085 \text{ mg/ml}$, $d = 0,1 \text{ cm}$; $> 250 \text{ nm}$: $0,85 \text{ mg/ml}$, $d = 1 \text{ cm}$

15.

[Análisis de amino-ácido]:

Punto isoelectrico: $6,8 \pm 0,2$ (determinado por formación de foco eléctrico).

Ejemplo 1

20.

a) El extracto en bruto de células de E.Coli necesario para la realización del procedimiento según la invención, es obtenido de tal manera que se cultiva E.Coli conforme a la Patente alemana No. 1.111.778, se concentra el cultivo por centrifugación hasta su consistencia fangoso, y desintegran las células de tal modo que, después de la adición de 3 % de metilisobutilcetona y después del ajuste del valor pH a 7,5 se agita durante varias horas.

25.

b) 90 litros de un extracto en bruto así obtenido, de acuerdo con la invención fueron ajustados al valor pH de 5,0 y centrifugados. Se obtuvieron 80 litros de solución clara que contiene 62000 unidades con la actividad específica

30.



- de 0,25 E/mg. Por introducción bajo agitación de intercambia-
dores de hecho mixto (Lewatit M 600 y S 100), la solución fué
desalada hasta la conductibilidad de 1,5 m/S. Después de la
filtración de los intercambiadores de iones, bajo reajuste
5. del valor pH a 5,0, se agregaron 350 g de bentonita (Tipo SF,
casa Serva, Heidelberg), se agitó durante 30 minutos y se se-
paró la bentonita en una centrífuga de paso continuo. La ben-
tonita separada por centrifugación se sometió a la elución
con 5 litros de un amortiguador de fosfato de sodio 0,5-molar
10. a un valor pH de 8,0 y se la separó por filtración. Se obtu-
vieron 5,2 litros que contienen 40000 E (Unidades) (65 %) de
la actividad específica de 1,45 E/mg.
- c) 9000 E de este producto de elución fueron desaladas me-
diante filtración por gel y ajustadas al valor pH de 5,0;
15. entonces se las hicieron pasar por una columna de 5 x 100 cm
de SE-Sephadex, equilibrada con acetato de sodio 0,05-molar,
pH de 5,0. La elución se efectuó con un gradiente lineal de
cada vez 4 litros de acetato de sodio 0,07 molar y 0,25-molar,
pH de 5,0. Las fracciones activas reunidas contenían 8100 E
20. (90 %). Después de la concentración por precipitación con
sulfato de amonio hasta la saturación al 70 %, la actividad
específica era de 5,8 E/mg.
- d) A la solución concentrada de la enzima se agregó una so-
lución saturada de sulfato de amonio, hasta la saturación
25. a aproximadamente un 50 %. Un leve enturbiamiento con ésto
formado fué eliminado por centrifugación. En un reposo a 4°C,
al cabo de unos días comenzó la cristalización.

Ejemplo 2

30. 60 litros de un extracto en bruto preparado y desinte-
grado conforme al Ejemplo 1a), fueron ajustados a un valor pH



5. de 5,0 y sometidos a la centrifugación. La solución clara superior contenía 92000 E (unidades) de la actividad específica 0,45. Por adición de intercambiadores de iones de lecho mixto, se desaló hasta una conductibilidad de 1,0 m/S. A esta solución se agregaron a un valor pH de 5,0 primeramente 150 g de bentonita y luego se los separaron por centrifugación. Entonces se agregaron otros 200 g de bentonita, se los separaron también por centrifugación y se los sometieron a la elución con 5 litros de acetato de sodio 1-molar, pH = 8,0. Resultado: 51000 E (53 %) de la actividad específica de 1,8 E/mg.

10. El producto de elución fué librado de sal mediante filtración por un gel y del mismo, como se ha descrito en en Ejemplo 1c), se obtuvo por cromatografía sobre SE-Sephadex una solución de la enzima pura. Se concentró la solución y se cristalizó la penicilinacilasa por adición de una solución saturada de sulfato de amonio, como se ha indicado en el Ejemplo 1d).

Ejemplo 3

20. Un extracto desintegrante obtenido de 2900 litros de cultivo de E.Coli, se ajustó al valor pH de 5,0 y se centrifugó. La solución clara superior (256 litros) contenía 150000 E (unidades) de la actividad específica 0,32. Por dilución con agua hasta 920 litros, la conductibilidad específica fué reducida hasta 2 m/S. Se agregó 1 kg de bentonita y, después de la agitación durante una hora, se la separó por centrifugación. La elución con acetato de sodio 0,5 molar al valor pH de 8,0 dió 6,9 litros que contenían 62000 E (unidades) de la actividad específica de 1,2 E/mg. Por una segunda elución de la bentonita con fosfato de sodio, 0,5 molar,
- 25.
- 30.



se obtuvieron otras 9800 E (unidades). Rendimiento total = 47 %.

5. 47000 E del producto de la primera elución fueron li-
bradas de sal mediante filtración por un gel, ajustadas al va-
lor pH de 5,0 y por introducción bajo agitación de aproxima-
damente 400 litros de SE-Sephadex equilibrados con acetato de
sodio, 0,05 molar pH = 5,0, fueron adsorbidas cuantitativamen-
te. El gel de SE-Sephadex fué separado por filtración y car-
gada en una columna de 5 cm de diámetro que ya contenía 1600
10. ml de SE-Sephadex nuevo en acetato de sodio, 0,05 molar, pH= 5,0. Entonces se efectuó la elución con un gradiente lineal de cada vez 4 litros de acetato de sodio, 0,07 molar y 0,25 molar, pH = 5,0. Las fracciones activas reunidas contenían 36000 E de la enzima pura con la actividad específica de 5,3
15. E/mg.

Se concentró la solución de la enzima pura y se la mez-
cló cuidadosamente hasta que se produjo un leve enturbiamien-
to con sulfato de amonio sólido. La cristalización procedió
al cabo de unos días a 4°C.

20.

Ejemplo 4

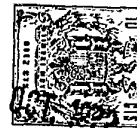
- a) El extracto en bruto de E.Coli necesario para la realiza-
ción del procedimiento según la invención, es obtenido de
tal manera que se concentra un cultivo de E.Coli ATCC 21 728
por centrifugación hasta su estado fangoso y se desintegran
25. las células según procedimientos mecánicos conocidos, eventual-
mente bajo adición de 3 % de metilisobutilcetona.
- b) 610 litros de un extracto en bruto así obtenido contienien-
do $1,3 \cdot 10^6$ E (unidades), conforme a la invención, se di-
luyeron con agua desionizada hasta 2100 litros, se ajustó el
30. valor pH con ácido sulfúrico a 5,0 y se centrifugó. En la ca

407600

- 14 -



- pa clara superior se encontraron $1,42 \cdot 10^6$ E con una actividad específica de 0,42 E/mg. Bajo reajuste del valor pH a 5,0, se introdujeron 13,8 kg de bentonita (Tipo B II, casa Erbslön) y, al cabo de 30 minutos, se los eliminaron en una centrífuga de paso continuo. La bentonita separada se sometió a la elución con 90 litros de una solución de acetato de sodio 0,5 molar, pH = 8,0, y subsiguientemente se la separó por filtración. Se obtuvieron 92,5 litros que contenían $1,12 \cdot 10^6$ E (86 %) con una actividad específica de 1,64 E/mg).
- 5.
10. c) 1 litro del eluido de bentonita obtenido según b) fué diglizado contra un amortiguador de fosfato de potasio, 0,001 molar, pH = 7,0, resultado: 8250 E con 1,8 E/mg.
- La solución de enzima se hizo pasar sobre una columna 10 x 15 cm de DEAE-Sephadex A-50 en el mismo amortiguador.
15. Subsiguientemente se efectuó la elución con un gradiente lineal de cada vez 2 litros de un amortiguador 0,01 molar y 0,1 molar, pH = 7,0. Se recogieron fracciones de 25 ml. Penicilina nacilasa se encontró en las fracciones 110 a 170; 1,2 litros. 6760 E (82 %) con 6 E/mg.
20. d) La solución de c) fué precipitada por adición de sulfato de amonio sólido (472 g/litro), el precipitado fué separado por centrifugación y disuelto en agua. Una parte de esta solución, conteniendo 4700 E, fué mezclada con sulfato de amonio hasta la saturación al 46 %, centrifugada hasta la condición clara y guardada a la temperatura ambiente. Dentro de
25. una semana comenzó la cristalización. Los cristales fueron aislados por centrifugación, disueltos en un amortiguador de fosfato 0,01 molar y dializados contra el mismo amortiguador resultado: 3300 E (70 %) con 12,45 E/mg.



Ejemplo 5

- 60 litros de un extracto en bruto desintegrado, preparado según el Ejemplo 4a), fueron ajustados a un valor pH de 5,0 y centrifugados. La solución clara de la capa superior
5. contenía 155 000 E (unidades) de la actividad específica de 0,3 E/mg. Por adición de intercambiadores de iones, se desaló hasta la conductibilidad específica de 1,0 m/S. A esta solución del valor pH de 5,0 se agregaron primeramente 200 g de bentonita (Tipo SF, Casa Serva) que luego se separaron por
10. centrifugación y se desecharon; entonces se agregaron otros 800 g de bentonita que luego se separaron por centrifugación y se sometieron a la elución con 20 litros de una solución de acetato de sodio 0,5-molar, pH = 8,0. Resultado: 110000 E con 1,5 E/mg.
15. Se dializó la solución de enzima contra un amortiguador de acetato de sodio 0,5-molar, pH = 5,0 y se la hace pasar sobre una columna, 11 x 95 cm, cargada con SE-Sephadex C-50 en un amortiguador de acetato de sodio 0,05-molar, pH = 5,0. Se sometió la columna a la elución con un gradiente de
20. cada vez 15 litros de amortiguador de acetato de sodio 0,07 y 0,25-molar, pH 5,0. Penicilinacilasa fué hallado en el eluido de 24-27 litros. Resultado: 88000 E (80 %), 4,2 E/mg.
25. 29 000 E de esta solución se dializaron contra un amortiguador de fosfato de potasio 0,01 molar, pH 7,0 y cargados sobre una columna de 11 x 25 cm de DEAE-Sephadex A-50 en fosfato de potasio 0,01 molar pH 7,0. Se sometió a la elución con un gradiente de fosfato de potasio de 0,01 a 0,1 molar, pH 7,0. Penicilinacilasa fué eluida hacia el final del gradiente. Resultado: 21000 E (73 %), 11,2 E/mg.
30. Una parte de esta solución, conteniendo 6000 E, fué



5. llevada con sulfato de amonio sólido hasta una saturación al 45 % aproximadamente. Al cabo de alrededor de 2 semanas, se formaron cristales grandes sobre la pared del recipiente. Al cabo de otras 2 semanas a la temperatura ambiente, se aislaron los cristales por centrifugación y se disolvió una parte alicuota en agua. Rendimiento: 4260 E (71 %), 13,1 E/mg.

Ejemplo 6

10. Un fluido de bentonita preparado según el Ejemplo 4 y conteniendo 4100 E (unidades) con 2,0 E/mg, se dializó contra un amortiguador 0,05-molar, pH = 5,0, y se hizo pasar sobre una columna, 2,5 x 25 cm, con Lewatit Sp-100 forma de Na⁺. Se efectuó la elución con un gradiente de acetato de sodio 0,05 a 0,5 molar, pH = 5,0. Las fracciones activas contenían 2020 E (56 %), 6,6 E/mg.

15. La solución de enzima fué ajustada a un valor pH de 6,5 y por adición de sulfato de amonio sólido hasta una saturación al 48 %, la enzima pura fué llevada a la cristalización. Resultado: 1250 E (62 %), 12,1 E/mg.

- N O T A -

20. Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas, son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental. También se hace constar que el invento corresponde a dos Solicitudes de Patente, presentadas en

25. Alemania, con fechas y números siguientes: 14 de octubre de 1971, n° P 21 51 236.7, y, 13 de abril de 1972, n° P 22 17 745.3, acogiéndose por lo tanto a los beneficios que conceden Los Convenios Internacionales en vigor, siendo lo que

30. constituye la esencia del referido invento y por lo que se



solicita Patente de Invención por 20 años en España, sobre:
PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE PENICILINACILASA CRISTALI-
NA PURA; caracterizándose por lo siguiente:

5. 1ª.- Procedimiento para la obtención de penicilinacilasa cristalina pura, caracterizado porque un extracto en bruto de células de E.Coli que, además de penicilinacilasa, contiene todavía fragmentos de células de E.Coli, se ajusta a un valor pH de 3,5 a 5,5, preferiblemente a 5,0 y se somete el extracto a una centrifugación; se trata la solución clara de penicilinacilasa obtenida como capa superior con silicatos de aluminio, preferiblemente bentonita, se separa el adsorbato y se efectúa la elución; se cromatografía la solución clara enriquecida obtenida de la penicilinacilasa sobre intercambiadores macroporosos de iones, y de la solución así obtenida de la penicilinacilasa parcialmente purificada la enzima pura se lleva a la cristalización por adición de sulfato de amonio eventualmente disuelto en agua.
10. 2ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque, el intercambiador de iones, es un intercambiador de aniones.
15. 3ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque, el intercambiador de iones, es un intercambiador de cationes.
20. 4ª.- Procedimiento según la reivindicación 1ª, caracterizado porque, el intercambiador de iones, es un intercambiador de aniones y un intercambiador de cationes sucesivamente en sucesión arbitraria.
- 25.

Handwritten mark or signature.



407600

5ª.- Procedimiento para la obtención de penicilinaci-
lase cristalina pura, tal y como queda sustancialmente descri-
to en la presente Memoria e ilustrado en los adjuntos dibujos.

Esta Memoria consta de 18 hojas, escritas a máquina por
una sola cara.

5.

Madrid 13 OCT. 1972

BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

J. GOMEZ ACEBO Y MODET
p. Firmado: L. Garcia Fernández

407600

16 NOV 1972

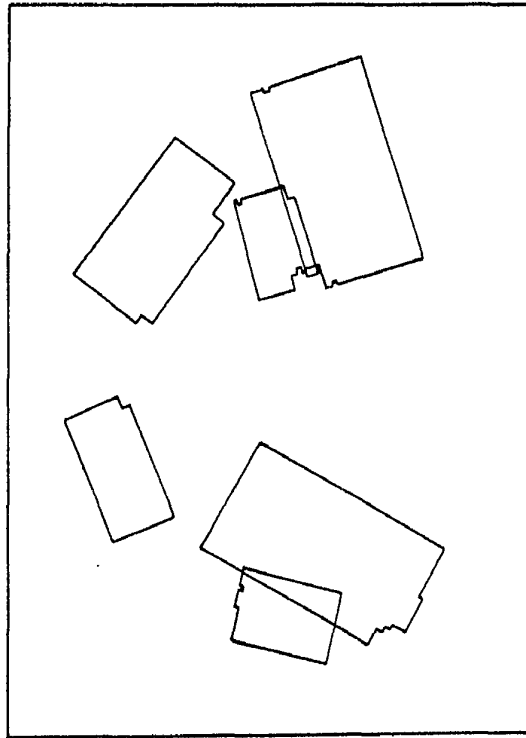


FIG. 1

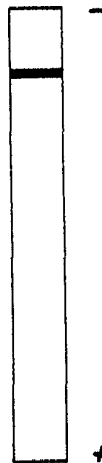


FIG. 2

16 NOV. 1972

J. GOMEZ ACEBO Y MODAT
p. p. Firmador L. Gaeta Fernandez

4076006

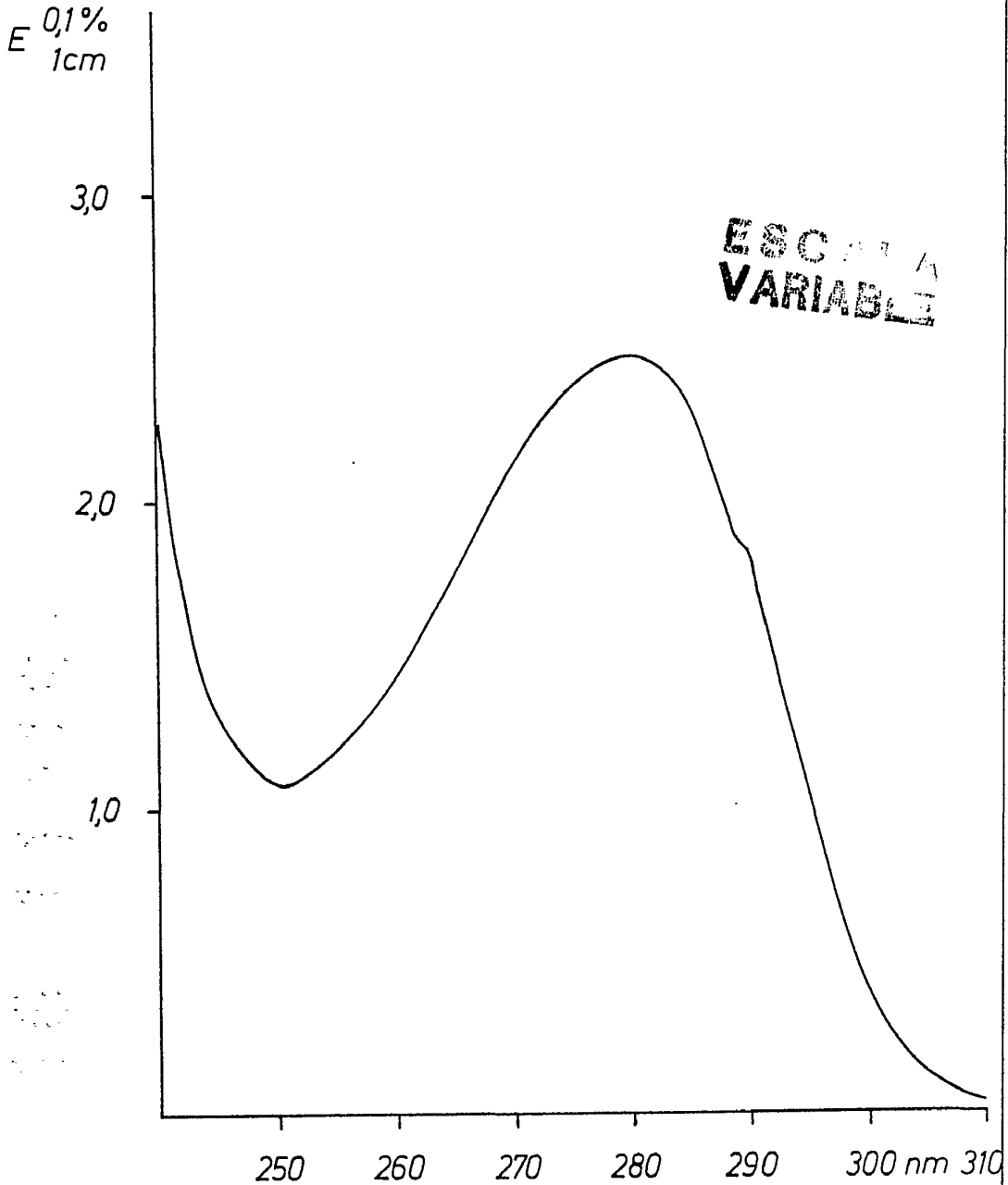


FIG. 3A

16 NOV. 1972

Madrid

J. GÓMEZ ACEBO Y MODESTO
S. p. Elmadat L. Gorta Fernández

407600



16 NOV 1972

$E_{0,1\%}$
1cm

3,0

2,0

1,0

260 270 280 290 300 nm 310

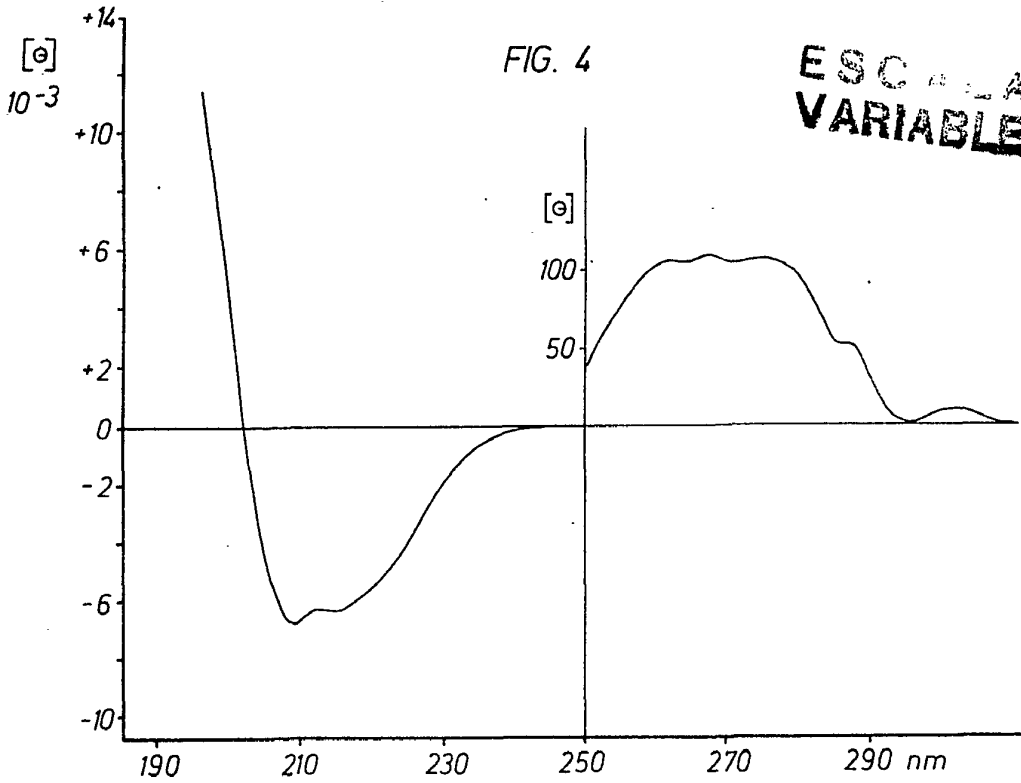
ES CAL
VARIABLE

FIG. 3B

16 NOV 1972

J. GOMEZ ACEBO Y COLA
Dr. Es Elmerdo L. Grotz Hernandez

16 NOV 1972
407000



Madrid 16 NOV 1972

J. GOMEZ ACEBO Y MUDET

p. p. Firmado L. Gomez Acebo