

486162

MINISTERIO DE INDUSTRIA
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

(19) ES	(21) 486162	(10) A3
(22)	FECHA DE PRESENTACION 20.11.1979	

PATENTE DE INTRODUCCION

Concedido el Registro de acuerdo con los datos que figuran en la presente descripción y en el contenido de la Memoria adjunta.

(47) FECHA DE PUBLICIDAD	(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL C12D 9/06
(64) TITULO DE LA INVENCIÓN "PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE ACIDO 6-AMINOPENICILANICO"	
(59) PATENTE EXTRANJERA U OTRA FUENTE DE INFORMACION Patente Japonesa nº 53-111443, del 11.9.1978	
(71) SOLICITANTE (S) TOYO JOZO KABUSHIKI KAISHA	
DOMICILIO DEL SOLICITANTE 632-1, Mifuku, Ohito-cho, Tagata-gun, Shizuoka-ken, JAPON	
(72) INVENTOR (ES) Kunio MATSUMOTO, y Hideji SELJO	
(73) TITULAR (ES) TOYO JOZO KABUSHIKI KAISHA	
(74) REPRESENTANTE VICTOR GIL VEGA	

POOR
QUALITY

MEMORIA DESCRIPTIVA

Esta invención se relaciona con un proceso de producción de ácido 6-aminopenicilánico mediante uso de enzima inmovilizada. Se conoce ya la producción de este ácido a partir de penicilina mediante método químico o enzimático. En un método de deacilación química, se protege la penicilina por un grupo éster procediéndose seguidamente a la formación de iminocloruro e iminoéter y a su hidrolización para formar ácido 6-aminopenicilánico. Este proceso presenta ciertas desventajas debido a su complejidad y a la contaminación por impurezas. Un proceso enzimático presenta también una serie de desventajas; por ejemplo, se emplea una inferior concentración de penicilina y la mezcla de reacción debe ser concentrada, a pesar de la inestabilidad térmica del ácido 6-aminopenicilánico, debido a una reacción diluida.

Hemos descubierto que se obtiene una acilasa de penicilina inmovilizada de elevada actividad específica cuando se combina una enzima con un vehículo polímero de tipo acrilonitrilo dotado de estructura porosa; se consigue un rendimiento en ácido 6-aminopenicilánico superior al 95% con una superior concentración de sustrato, del 3 al 12% peso/volumen, de penicilina natural; no se requiere ninguna concentración para aislar el citado ácido por precipitación isoeléctrica; un tiempo prolongado y una múltiple reutilización de la acilasa de penicilina inmovilizada determinan un inferior costo de producción de tal ácido y pueden emplearse para la reacción de deacilación no sólo el polvo de penicilina aislada

do y purificado, sino también una solución acuosa de penicilina extractada.

La presente invención se completa con los citados descubrimientos y se relaciona con un proceso de producción de ácido 6-aminopenicilánico, caracterizado porque se deacila enzimáticamente bencilpenicilina (penicilina G) o fenoximetilpenicilina (penicilina V) mediante el empleo de acilasa de penicilina inmovilizada, combinada con un vehículo polímero de tipo acrilonitrilo aminado e insoluble en agua.

Una penicilina usada en esta invención es la conocida penicilina natural, que puede deacilarse mediante acilasa de penicilina o su sal soluble en agua. Ejemplos de penicilina natural son las bien conocidas penicilina G ó penicilina V. Ejemplos de sal soluble en agua son las sales conocidas que no ejercen ningún efecto nocivo en la actividad de la acilasa de penicilina, por ejemplo una sal alcalina, tal como sódica o potásica. También puede usarse para la deacilación un extracto de fermentación de penicilina, tal como una fase acuosa rica en penicilina, transferida desde el extracto de disolvente orgánico del filtrado del caldo de fermentación de la penicilina, no mezclable con agua.

Una acilasa de penicilina enzimática es una enzima conocida dotada de especificidad de sustrato para la penicilina y que hidroliza ésta en ácido 6-aminopenicilánico. La enzima usada en la presente invención está constituida por células cultivadas o por un preparado enzimático obtenido de un filtrado de cultivo de conocidos microorganismos productores de acilasa de pe-

nicilina.

La citada enzima se produce mediante el proceso conocido y es una enzima parcial o completamente purificada.

- 5 Ejemplos de microorganismos productores de acilasa de penicilina son los siguientes:
- | | | |
|----|---|---------------------|
| | <i>Actinoplanes utahensis</i> | ATCC14539 |
| | <i>Arthrobacter tumescens</i> | ATCC6947 |
| | <i>Arthrobacter viscosus</i> | ATCC15294 |
| 10 | <i>Bacillus megaterium</i> | ATCC14945 |
| | " | ATCC14946 |
| | " | B - 400 FERM - P743 |
| | <i>Erwinia stewartii</i> | ATCC13531 |
| | <i>Escherichia coli</i> | ATCC9637 |
| 15 | " | ATCC11105 |
| | " | ATCC13529 |
| | " | NCIB8743 |
| | " | NCIB8743A |
| | <i>Flavobacterium suaveloens</i> | ATCC13533 |
| 20 | <i>Micrococcus candidus</i> | ATCC3456 |
| | <i>Micrococcus roseus</i> | ATCC416 |
| | <i>Micromonospora purpureochromogenes</i> | ATCC13634 |
| | <i>Nocardia</i> sp. | ATCC13635 |
| | <i>Proteus rettgeri</i> | ATCC9250 |
| 25 | " | ATCC31052 |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | NRRL1014J |
| | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | NRRL1B10 |
| | <i>Pseudomonas maltophila</i> | ATCC17808 |
| | <i>Serratia rubidaea</i> | ATCC181 |
| 30 | <i>Streptomyces griseus</i> | IFO3355 |

Streptomyces lavendulae ATCC13664

" ATCC13665

" ATCC21138

5 Puede utilizarse la otra acilasa. También puede
de emplearse una acilasa de penicilina producida por hongos
descritos en "Advances in Applied Microbiology", Vol. 17,
págs. 311 - 369, 1974, Ed. E.J. Vandamme y colaboradores.
En este caso, se usa ventajosamente la penicilina V.

10 Un vehículo para la combinación de la acilasa
de penicilina es un polímero de tipo acrilonitrilo insoluble
en agua dotado de grupos aminos libres, por ejemplo un
homopolímero de monómeros de tipo acrilonitrilo, tales como
acrilonitrilo, metacrilonitrilo, alfa-clorocrilonitrilo,
15 cinnamonitrilo o similares, o un copolímero de tales
monómeros o bien un copolímero de éstos con otros
comonómeros que contengan enlaces dobles etilénicos
insaturados.

20 El citado vehículo polímero de tipo acrilonitrilo
deberá ser ventajosamente de naturaleza porosa. Para
obtener una estructura porosa, por ejemplo se somete
el acrilonitrilo a polimerización en suspensión o en emul-
sión en condiciones de homopolimerización o copolimeriza-
ción. Como variante, el polímero de tipo acrilonitrilo,
25 disuelto en un disolvente soluble, tal como dimetilforma-
mida, sulfóxido dimetílico, solución concentrada de rodato
acuoso en ácido nítrico o solución acuosa de cloruro
de cinc, se añade a gotas o se extrusiona en forma fila-
mentosa o membranosa de estructura porosa en un baño coa-
30 gulante que contenga agua, acetona acuosa, etanol acuoso

o dimetilformamida acuosa para formar partículas, filamentos o películas. También pueden prepararse filamentos huecos.

En la siguiente operación, se introducen grupos aminos libres en el polímero de tipo acrilonitrilo para obtener un polímero de tipo acrilonitrilo aminado, concretamente un vehículo de la presente invención. Como quiera que una reacción de deacilación, en la que se use acilasa de penicilina inmovilizada y combinada con el vehículo debe llevarse a cabo, en un medio acuoso, la introducción de grupos aminos deberá efectuarse en una medida tal que proporcione un vehículo insoluble en agua. Pueden emplearse varias reacciones conocidas. Por ejemplo, puede utilizarse un método que reduzca grupos nitrilos del polímero de tipo acrilonitrilo a grupos aminos. Cuando el citado polímero tenga una estructura porosa, la reducción puede efectuarse preferiblemente en un material no disolvente inerte que no disuelva el citado polímero, a fin de evitar la destrucción de la estructura porosa. Un ejemplo preferible de agente reductor es el hidruro de litio y aluminio. Un ejemplo de material no disolvente inerte es un medio orgánico tal como el éter dietílico, dioxano o tetrahidrofurano. La temperatura de reacción es a nivel ambiente o dentro del punto de ebullición del material no disolvente usado. El tiempo de reacción puede variar según la temperatura, el polímero usado, su forma, su estructura o su grado de polimerización, siendo aproximadamente de 1 a 48 horas. Como resultado de la citada reacción, los grupos nitrilos del referido polímero son parcialmente reducidos a grupos ami-

nos. La animación debe terminarse dentro de unos valores del orden de 20 μ M de grupo amino por gramo de vehículo, y vehículo sustancialmente no soluble en agua. Si se desea, el vehículo así obtenido es lavado con agua, solución ácida o solución alcalina.

5

Otro método de reducción de grupo nitrilo a grupo amino es el de la reducción catalítica de polímero de tipo acrilonitrilo en un autoclave, en el citado polímero. En esta reacción, la aminación se produce con exceso y puede obtenerse producto soluble en agua, que también requiere una operación de formación de una estructura porosa. Por consiguiente, este método no es ventajoso.

10

Otro método de obtención de polímero de tipo acrilonitrilo aminado consiste en la reacción de tal polímero de tipo acrilonitrilo, provisto de grupos de átomos halógenos, especialmente de átomos de cloro, con amoníaco para sustituir los grupos aminos libres por grupos de átomos de cloro.

15

Otro método consiste en la reacción de un polímero de tipo acrilonitrilo, dotado de grupos epoxilos, con lisina o alquilenodiamina, tal como diamina hexametilénica o diamina dodecametilénica. También puede obtenerse mediante degradación Hoffman de copolímero de un monómero de tipo acrilonitrilo y de un monómero vinílico de tipo amido, concretamente un polímero de tipo acrilonitrilo dotado de un grupo amido. Otro método consiste en la sujeción a nitración de un copolímero de monómero vinílico aromático, tal como uno de tipo estireno, divinilbenceno o viniletilbenceno, y de monómero de tipo acrilonitrilo, en una mezcla de ácido nítrico concentrado y ácido sul

25

30

fúrico, si el compuesto no tiene ningún grupo nitro, para formar polímero de tipo acrilonitrilo provisto de grupos nitros, reduciéndose luego estos grupos mediante hidrosulfito sódico e hidróxido potásico. Otro método consiste en el tratamiento con amoníaco de un copolímero de monómero tipo acrilonitrilo y cetona metilvinílica.

El vehículo así obtenido tendrá preferiblemente una estructura porosa, en forma de filamentos, partículas, membranas o fibras huecas. La citada estructura porosa consta presuntamente de macroporos que permiten el paso o penetración de acilasa penicilínica de proteína biológicamente activa en porciones internas, y de microporos que atrapan dicha acilasa sobre la superficie de aquellas porciones internas. El tamaño de los poros es de 100 a 2000 Å aproximadamente.

La inmovilización de la acilasa penicilínica en el vehículo puede conseguirse por un método de adsorción física o un método de combinación covalente (método de enlace transversal del vehículo). Estos métodos de inmovilización son el bien conocido método de combinación de enzimas en el vehículo, describiéndose métodos convencionales en "Immobilized Enzymes" (en la Ed. japonesa de Ichiro Chibata, Kodansha Publishers, Japón).

Ejemplos de métodos de inmovilización son la combinación directa de grupos aminos del vehículo y acilasa penicilínica mediante un agente de enlace transversal, tal como glutaraldehído, o bien una combinación a través de un grupo espaciador, tal como lisina o hexametileno diamina. Como variante, se reaccionan grupos aminos del vehículo con un agente introductor de grupos car

boxilos, tal como anhídrido succínico, y seguidamente se combinan dichos grupos carboxilos con acilasa penicilínica por el conocido método sintético con péptidos, o bien se condensa el vehículo directamente con la citada acilasa empleando un agente condensador, por ejemplo uno soluble en agua, tal como 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida.

En la enzima inmovilizada, el método de adsorción física es más activo sobre la actividad enzimática respecto al vehículo que el método de combinación covalente. Sin embargo, este último método presenta determinadas ventajas, en el sentido de que proporciona una fuerte unión entre el vehículo y la enzima y, por consiguiente, pueden evitarse fugas de enzimas en una operación prolongada, con el adicional resultado ventajoso de una buena estabilidad en otro factor tal como el calentamiento o el valor del pH.

La penicilina se trata con la enzima inmovilizada en un medio acuoso y por consiguiente, debido a la naturaleza insoluble en agua de la citada enzima, puede aplicarse el método por cargas o el método en columna. En el método por cargas, la enzima inmovilizada se suspende en solución penicilínica mientras se agita y se ajusta a un pH constante. La enzima inmovilizada se recupera por filtración o centrifugación a partir del medio de reacción, pudiéndose utilizar de nuevo.

En el método de columna, se rellena ésta con enzima inmovilizada y se pasa a través de ella la solución penicilínica. El ritmo de paso será preferiblemente lo más elevado posible, con recirculación. Mediante la

reacción de deacilación se controla el ritmo de paso a través de la columna en un tiempo determinado, pudiendo limitarse el descenso del pH por formación de ácido carboxílico. Un medio de reacción pasado a través de la columna es enfriado y atrapado en un recipiente de almacenamiento, ajustándose en el mismo un pH constante de 6,5 a 9,5 mediante adición de hidróxido alcalino y recirculándose luego el medio a través de un dispositivo de cambio de calor. Mediante este procedimiento, se impide una pérdida de la actividad de la enzima inmovilizada debida a un descenso del pH y a descomposición de la penicilina y se promueve la reacción de deacilación. Para reducir al mínimo la pérdida de actividad por la presión, se empleará ventajosamente un lecho de columna más amplio, realizándose ordinariamente la recirculación del flujo en 100 a 300 volúmenes de lecho y continuándose hasta que más del 90% de penicilina se ha transformado en ácido 6-aminopenicilánico.

La anterior reacción enzimática se efectúa ordinariamente a una temperatura de 15° a 40°C. El pH óptimo de la reacción depende de la producción de tensión por la acilasa penicilínica y es habitualmente de 6 a 9. El tiempo de reacción varía con la actividad de la enzima, la concentración del sustrato y el ritmo de flujo, y es aproximadamente de 1 a 10 horas.

La concentración de penicilina en la anterior reacción enzimática es del orden de 1% al 20% peso/volumen; sin embargo, es preferible una concentración del 3% al 12% peso/volumen para un superior ritmo de reacción, ritmo de reutilización y prevención de pérdida de activi

dad por la enzima inmovilizada.

El aislamiento y purificación del ácido 6-aminopenicilánico de la mezcla reactiva puede realizarse por métodos convencionales conocidos. Por ejemplo, la penicilina y el ácido carboxílico que quedan en la mezcla de reacción son separados en condición ácida mediante disolvente orgánico no mezclable con agua, tal como cetona metil-isobutílica, acetato etílico y acetato butílico, y se ajustan a un pH de 4,3 para precipitar isoelectricamente ácido 6-aminopenicilánico, o bien, después de añadir disolvente orgánico mezclable con agua, tal como acetona o metanol, a la mezcla de reacción, precipita ácido 6-aminopenicilánico mediante ajuste del pH en 4,3. En esta invención, debido a la elevada concentración del sustrato, el ácido 6-aminopenicilánico es directamente cristalizado de la mezcla de reacción con un rendimiento y pureza elevados.

Método de ensayo de la actividad de la acilasa penicilínica

1) Solución enzimática:

Mezcla de reacción:	solución enzimática	0,5 ml
	neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5)	4,0 ml
	penicilina potásica 3 4% (peso/volumen) / neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5)	0,5 ml

La anterior mezcla de reacción se incuba a 37°C durante 30 minutos. Se añade 0,5 ml de la mezcla de reacción incubada a una mezcla de un neutralizador (3 ml) consisten

te en NaOH 0,05 N (1 ml) y ácido acético al 20% (2 ml) y solución de p-dimetilaminobenzaldehído en metanol al 0,5% (peso/volumen) (0,5 ml), incubándose luego durante 10 minutos. Se mide la adsorción a 415 mμ para ensayar una cantidad formada de ácido 6-aminopenicilánico.

Una unidad (1 U) de enzima se define como la actividad que produce 1 μmol de ácido 6-aminopenicilánico por minuto.

2) Enzima inmovilizada:

Se añade un peso alícuoto de enzima inmovilizada a una mezcla de neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5) (0,5 ml) y se incuba a 37°C durante 30 minutos. La cantidad producida de ácido 6-aminopenicilánico se mide como en el procedimiento anterior.

Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención, pero sin limitarla a ellos.

Ejemplo referencial 1

Preparación de un vehículo para enzima inmovilizada.

Se añadieron fibras de poliacrilonitrilo (con más de un 90% de acrilonitrilo) (2,0 g), dotadas de una estructura porosa, a éter seco (160 ml) que contenía hidruro de litio y aluminio (2,0 g) y se refluó a 50°C durante 1 hora. Se filtró la mezcla de reacción y se lavó el filtrado sucesivamente con éter dietílico, una pequeña cantidad de agua, ClH 1N, agua, NaOH 1N, agua y neutralizador fosfato de 0,1 M (pH 7,50), en este orden, para obtener fibras de poliacrilonitrilo aminado, dotadas de estructura porosa (9,5 g, peso en húmedo).

Ejemplo referencial 2

Se vertieron hidruro de litio y aluminio (2,5³g) y éter seco (100 ml) en un matraz de 3 cuellos, con agitación. Se añadieron gránulos de poliacrilonitrilo (2 g) dotados de estructura porosa y se refluyó durante 16 horas.

5 Se enfrió la mezcla de reacción y se le añadió a gotas agua para descomponer el hidruro de litio y aluminio sin reaccionar, agregándose luego a gotas ClH 1N para disolver el citado material descompuesto. Se filtró la mezcla de reacción y se recuperó el poliacrilonitrilo aminado,
10 que se lavó sucesivamente con ClH 1N, agua, NaOH y neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5), en este orden, para obtener un vehículo granulado provisto de una estructura porosa.

Ejemplo 1

15 1) Preparación de concentrado de acilasa penicilínica

Se dispuso cada medio (pH 7,0) (20 l.) consistente en un 1% de polipeptona, un 1% de extracto de carne y un 0,5% de ClNa en cinco fermentadores de frascos de 30 l. y se esterilizaron a 120°C durante 20 minutos. Cada cultivo de semillas (200 ml) de Bacillus megaterium B-400
20 FERM-P 748 fue inoculado y cultivado a 30°C durante 72 horas bajo aireación de 20 l/minuto y agitación a 300 rpm.

Después del cultivo, se combinó la masa cultivada y se separaron las células cultivadas mediante una
25 centrifugadora Westfalia. Se añadió Celite (nombre comercial, producto de Johns Manville Sales Co., nº 560) en una cantidad de 900 g al filtrado de cultivo, se agitó durante unos 30 minutos y se filtró. La enzima de Celita así obtenida (aproximadamente 20 U/g de actividad de la
30 acilasa penicilínica) (1,8 kg) fue suspendida en agua,

introducida como relleno en una columna (6,0 x 67 cm) y eluida con un 24% de sulfato amónico/solución de tris-hidroximetil-aminometano 0,1 M (pH 8,5) a un SV 0,5, para recoger fracciones (390 ml, 78 U/ml) que mostraron absorción a 280 nm.

Se repitió la misma operación y el filtrado obtenido (760 ml) se cargó en una columna de Biogel P-10 (50 a 100 mallas) (5,5 x 37 cm) neutralizado con neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5) y sometido a filtración en gel.

Se obtuvo solución enzimática (390 ml, 55 U/ml) sin contaminación de sal, que mostró absorción a 280 nm.

Se repitió la misma operación y la solución enzimática obtenida (2,3 l.) se introdujo en un tubo dialítico y se concentró aproximadamente a la mitad de su volumen en un 30% de Carbowax (peso molecular medio, 20.000 aproximadamente) / neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5) (20 l.), dializándose luego contra neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5), para obtener concentrado de acilasa penicilínica (1,1 litros, 120 U/ml).

ii) Preparación de acilasa penicilínica inmovilizada

Se añadió fibra de poliacrilonitrilo aminado (3 g), obtenida en el ejemplo referencial 1, a un 12,5% de glutaraldehído/neutralizador borato (pH 8,5) (200 ml) y se agitó a 0°C. Al cabo de 20 minutos se obtuvo un vehículo mediante filtración y se lavó con neutralizador borato (pH 8,5) y neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5). Se añadió este vehículo a la solución concentrada de acilasa penicilínica (240 ml) obtenida según se indica en el an-

terior apartado i) y se agitó durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de reposar a 5°C durante toda la noche, se filtró y lavó con ClNa 0,5 M/neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5) y neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5), para obtener fibra de acilasa penicilínica inmovilizada (11,2 g) (peso en húmedo) (865 U/g).

iii) Producción de ácido 6-aminopenicilánico

Se introdujo como relleno enzima inmovilizada (7,4 g) (peso en húmedo), obtenida como se expone en el anterior apartado ii), en una columna provista de camisa (2,6 x 27 cm), controlada a 25°C, y se pasó una solución (150 ml) de penicilina potásica G (10 g en neutralizador fosfato 0,02 M (pH 7,5) ajustado en 9,0) a un ritmo de flujo de 2,6 litros/hora. Se ajustó el material eluido a un pH de 8,7 a 9,3 mediante adición de solución de NaOH 4N en una caja de almacenamiento y refrigeración y se recicló a la columna a través de un cambiador de calor. Se continuó la operación durante 3 horas y se interrumpió la recirculación al no observarse disminución en el pH del material eluido. Se lavó una columna con neutralizador fosfato y se recogió solución recirculada y solución lavada (180 ml). Se añadió acetona (90 ml), se ajustó a un pH 4,3 agregando ClH 6N con enfriamiento y se mantuvo en reposo durante toda la noche en una caja de hielo. El precipitado fue recogido por filtración, lavado con acetona fría y secado, para obtener ácido 6-aminopenicilánico (5,3 g, rendimiento del 91%, pureza del 93%, penicilina G inferior al 0,5%, ácido fenilacético, inferior al 0,1%).

El anterior proceso ha sido designado como de

una carga, continuándose luego durante 80 cargas más de producción de ácido 6-aminopenicilánico. La actividad de la enzima inmovilizada disminuyó en un 50%; sin embargo no se observó ninguna disminución en el rendimiento ni pureza del citado ácido.

Ejemplo 2

Tal como se describe en el Ejemplo 1, se trató enzima de Celita mediante un 24% de sulfato amónico/fosfato disódico 0,1 M (pH 8,5, ajustado con NaOH). El material eluido, que mostraba absorción a 280 nm, fue sometido a ultrafiltración para separar los materiales de un peso molecular de 6.000 y para su desalinización. Una desalinización de hasta el 0,03% de concentración de sulfato amónico dio un concentrado de acilasa penicilínica (40 U/ml).

Ejemplo 3

Se añadió un vehículo granular dotado de estructura porosa (300 mg) (peso en húmedo) y obtenido tal como se explica en el Ejemplo referencial 2, a un 12,5% de glutaraldehído/neutralizador borato enfriado con hielo (pH 8,5) (50 ml), se agitó a 0°C durante 20 minutos y se filtró. El filtrado fue lavado con neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5), se le añadió enzima de acilasa (3 ml, 72 U/ml), producida por el Bacillus megaterium B-400, producido en un tubo de tipo L, se agitó a 30°C durante 60 minutos, se filtró y se lavó con ClNa 0,5 M/neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5) y neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5), para obtener acilasa penicilínica inmovilizada (actividad de la acilasa, 252 U/g).

Ejemplo 4

Se esteriliza a 120°C durante 30 minutos un medio (160 litros) que comprende un 2% de licor de destilación de maíz y un 0,2% de ácido fenilacético (ajustado a un pH de 7,0 mediante NaOH), en un tanque de fermentación de 250 litros. Se inoculó y cultivó asépticamente con una aireación de 150 litros por minuto, a 150 rpm, a 30°C y durante 17 horas, un cultivo de semillas (400 ml) de Escherichia coli ATCC 11105, desarrollado en la misma composición de aquel medio a 30°C durante 18 horas. Se centrifugó la masa cultivada mediante una centrifugadora tipo Westfalia para recoger células, las cuales (3,5 kg, peso en húmedo) se trataron de acuerdo con el método de E. Lagerlöf y colaboradores (Method in Enzymology, Vol. 44, 759-763, 1976) para obtener solución de acilasa penicilínica purificada (330 ml, 312 U/ml).

Se añadió fibra de poliacrilonitrilo aminado (3 g), obtenida según el Ejemplo referencial 1, a un 12,5% de glutaraldehído/neutralizador borato (200 ml, pH 8,5) y se agitó a 0°C durante 20 minutos. Se recogió vehículo por filtración, se lavó con neutralizador borato (pH 8,5) y neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5) y luego se añadió a una solución de concentrado de acilasa penicilínica (100 ml) en neutralizador fosfato 0,1 M (pH 7,5, 140 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 4 horas, se mantuvo en reposo durante toda la noche a 5°C, se filtró y se lavó con ClNa 0,5 M/neutralizador fosfato 0,1M (pH 7,5) y neutralizador fosfato 0,1M (pH 7,5), por este orden, para obtener acilasa penicilínica inmovilizada y fibrosa (11,5 g, peso en húmedo, 780 U/g).

Se produjo ácido 6-aminopenicilánico de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 1, junto con la acilasa penicilínica inmovilizada anteriormente obtenida cuyo ácido 6-aminopenicilánico se obtuvo en una cantidad de 5,2 g, rendimiento del 89,3% y pureza del 98%.

Los términos en que está redactada esta Memoria deben tomarse en sentido amplio, no limitativo.

REIVINDICACIONES

Se reivindica como de propio y nuevo en España, a favor de Toyo Jozo Kabushiki Kaisha, con domicilio en 632-1, Mifuku, Ohito-cho, Tagata-gun Shizuoka-ken (Japón), lo especificado en las siguientes reivindicaciones:

5 13.- Procedimiento de producción de ácido 6-aminopenicilánico, caracterizado porque se deacila enzimáticamente bencilpenicilina o fenoximetilpenicilina utilizando acilasa penicilínica inmovilizada, combinada con un vehículo de polímero tipo acrilonitrilo aminado e insoluble en agua.

15 21.- Procedimiento de producción de ácido 6-aminopenicilánico, según la reivindicación 13, caracterizado en que la citada acilasa penicilínica consiste en células cultivadas o en un preparado enzimático obtenido de un filtrado cultivado de microorganismos productores de acilasa penicilínica.

20 32.- Procedimiento de producción de ácido 6-aminopenicilánico, según la reivindicación 13, caracterizado en que los microorganismos productores de la acilasa penicilínica pertenecen a los géneros Actinoplanes, Arthrobacter, Bacillus, Erwinia, Escherichia, Flavobacterium, Micrococcus, Micromonospora, Nocardia, Proteus, Pseudomonas, Serratia o Streptomyces.

30 43.- Procedimiento de producción de ácido 6-aminopenicilánico, según la reivindicación 13, caracterizado en que el polímero de tipo acrilonitrilo amina insoluble en agua tiene una estructura porosa en forma de fibra, partícula, membrana o filamento hueco.

5a.- "PROCEDIMIENTO DE PRODUCCION DE ACIDO
6-AMINOPENICILANICO".

5 Tal y como se deja descrito en la memoria
precedente que consta de diecinueve hojas foliadas y me
canografiadas por una sola de sus caras.

Madrid, 20 de Noviembre de 1.979

E.A. de Toyo Jozo Kabushiki Kaisha

Victor Gil Vega:

