



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

217857

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³

C 12 N 11/08

(22) Přihlášeno 04 02 81
(21) (PV 820-81)

(40) Zveřejněno 28 05 82

(45) Vydáno 15 11 84

(75)
Autor vynálezu

JIRKŮ VLADIMÍR RNDr. CSc., VERJOVIČ BUDIMÍR ing. CSc., PRAHA,
TURKOVÁ JAROSLAVA ing. CSc., ČESKÝ BROD,
KUBÁNEK VLADIMÍR doc. ing. CSc., KRALUPY nad VLTAVOU

(54) Imobilizované kvasinkové buňky a způsob jejich výroby

Vynález se týká imobilizovaných kvasinkových buněk vázaných na nosiče, které jsou tvořeny polymerní látkou, například na bázi polyetylenotereftalátu, polykaprolaktamu, polyfenylenoxidu, blokového kopolymeru polyetylénoxid - polykaprolaktam, melaminoformaldehydové pryskyřice, který má mikroporézní strukturu o specifickém povrchu 1 až 700 m²/g. Obzvláště výhodné je, jestliže se na polymerní nosič nejprve sorbuje síťovací činidlo, například glutaraldehyd, a pak se vzniklý produkt nechá reagovat s buňkami. Dále výhodný je postup, kdy se na polymerní nosič adsorbuje glutaraldehyd a na vzniklou kompozici se vážou celé kvasinkové buňky a znovu zesílují glutaraldehydem. Imobilizaci buněk je vhodné provádět při teplotě 4 až 30 °C a pH prostředí od 4 do 7,5 po dobu 1 až 48 hodin. Kvasinkové buňky se permeabilizují před imobilizací nebo po ní.

Vynález se týká imobilizovaných kvasinkových buněk vázaných na nosiči a způsobu jejich výroby.

Imobilizace kvasinkových buněk na nosiči, jakožto producentu enzymu, má význam v tom, že enzymy není nutné izolovat nákladným procesem, purifikovat a přechovávat za určitých podmínek. Další význam spočívá v zachování enzymů v intracelulárním prostředí buňky, což přispívá ke stabilizaci enzymové aktivity, zachování optimálních podmínek enzymové reakce a vyloučení negativních vlivů extracelulárního prostředí.

Dosud se imobilizace buněk prováděla zakotvením buňky v gelu, membráně nebo mikropouzdrů, zakotvením buňky specifickou adsorpcí, vazbou buněk jejich kovalentním zesíťením nebo zakotvením buňky kovalentní vazbou na pevný nosič.

Při zachycení buňky v gelu, membráně či mikropouzdrů, eventuálně při vazbě buněk jejich kovalentním zesíťením, je podstatně nižší kontakt zakotvených buněk vzhledem k difúzní bariéře gelu nebo membráně se substrátem.

Při zakotvení buněk specifickou adsorpcí je možnost snadného uvolnění buněk, což je častou příčinou nízké aktivity hmotové jednotky imobilizovaného systému.

Zakotvení buněk kovalentní vazbou na pevný nosič vyžaduje obvykle neúměrně vysoké náklady na chemickou modifikaci povrchu nosiče.

Uvedené nedostatky v imobilizaci kvasinkových buněk odstraňuje předkládaný vynález. Podstata vynálezu spočívá v tom, že imobilizované kvasinkové buňky jsou navázány na nosiče tvořené polymerní látkou, například na bázi polyetyléntereftalátu, polykaprolaktamu, polyfenylenoxidu, blokového kopolymeru polyetylénoxid-polykaprolaktam, melaminoformaldehydové pryskyřice, který má mikroporézní strukturu o specifickém povrchu 1 až 700 m²/g.

Obzvláště výhodný je postup, kdy se na polymerní nosič nejprve sorbuje síťovací činidlo, například glutaraldehyd, a pak se vzniklý produkt nechá reagovat s buňkami.

Dále je výhodné, jestliže se na polymerní nosič adsorbuje glutaraldehyd a na vzniklou kompozici se vážou celé kvasinkové buňky a znovu zesíťují glutaraldehydem.

Imobilizaci buněk je vhodné provádět při teplotě 4 až 30 °C a pH prostředí od 4 do 7,5 po dobu 1 až 48 hodin. Kvasinkové buňky se permeabilizují před imobilizací nebo po ní.

Výhodou přípravy imobilizovaných buněk podle vynálezu je, že se získá pevně zakotvený enzymový systém, který je nerozpustný a tedy snadno separovatelný od rozpustného substrátu a produktu, což umožňuje jeho opakované použití.

Praktická aplikace imobilizovaných buněk, jakožto enzymového systému, se provádí jak vsádkovým, tak i kolonovým způsobem. Imobilizace celých kvasinkových buněk na porézní polymerní sorbent podle vynálezu probíhá kombinací prosté sorbce a kovalentní vazby. Aktivita připraveného zakotveného enzymového systému není negativně ovlivňována difúzní bariérou nebo dalšími negativními vlivy, které se projevují při použití jiných imobilizačních způsobech. Pro praktickou aplikaci imobilizovaných buněk podle vynálezu je rozhodující i to, že se využívá vhodného a laciného nosiče tj. sorbentu a jednoduchého způsobu provedení imobilizace. Polymerní sorbenty, tj. nosiče pro imobilizaci kvasinkových buněk podle předkládaného vynálezu se vyrábějí postupy, které spočívají v tom, že se polymer rozpustí v roztaženém rozpouštědle a po ochlazení roztoku na kompaktní hmotu, která se podrobí dalšímu mechanickému zpracování a potom se tavné rozpouštědlo dokonale vyextrahuje z polymerní struktury extrakčním činidlem, které dobře rozpouští tavné rozpouštědlo a neatakuje polymer. Získá se polymer obvykle v práškové formě s mikroporézní strukturou a vysokým měrným povrchem.

Tímto postupem byl připraven polymerní sorbent na bázi polyetyléntereftalátu za použití 6-kaprolaktamu jako rozpouštědla a vody jako extrakčního činidla. Specifický povrch u takto připraveného sorbentu se pohybuje obvykle od 70 do 100 m²/g, velikost částic se pohybuje od 20 až 30 μm. Tento polymerní sorbent je bílá, práškovitá hmota s dobrou chemickou a fyzikální stabilitou s bodem tání 255 °C.

Mikroporézní sorbent na bázi alkalického poly-6-kaprolaktamu se připravuje rozpuštěním polykaprolaktamu v kaprolaktamu při teplotě 190 °C a jako extrakční činidlo pro kaprolaktam se používá voda. Tento sorbent má specifický povrch kolem 15 m²/g a střední průměr sférických částic 110 Å s pravidelnou mikroporézní strukturou. Je chemicky a fyzikálně stálý, o bodu tání 216 °C.

Obdobným způsobem se připravuje i sorbent na bázi blokového kopolymeru polyetylénoxid-polykaprolaktam, přičemž se vychází z hotového kopolymeru. Měrný povrch tohoto sorbentu se pohybuje kolem 8 m²/g.

Sorbent na bázi poly-2,6-dimetylfenyloxydu se připravuje za použití kaprolaktamu jako rozpouštědla polyfenylenoxydu při teplotě 145 °C a extrakčního činidla vody. Sorbent má pravidelnou mikroporézní strukturu s úzkou distribucí pórů o specifickém povrchu kolem 700 m²/g.

Polykondenzační sorbent se připravuje polykondenzací melaminu s formaldehydem za přítomnosti anorganických solí, které se zabudují do polykondenzačního gelu a pro jeho vytvrzení se tato sůl vyextrahuje obvykle vodou. Tento sorbent má velikost zrna od 0,1 do 0,5 mm a měrný povrch 200 m²/g.

V dalším je vynález blíže objasněn na příkladech, které však rozsah vynálezu nijak neomezuji.

P ř í k l a d 1

Na sorbentu na bázi polyetyléntereftalátu o povrchu 550 m²/g a průměrné velikosti částic 0,25 mm byl adsorbován glutaraldehyd podle následujícího postupu: 1 g sorbentu byl suspendován v 10 ml 5 % objemových glutaraldehydu. Po 24 hodinách míchání za laboratorní teploty byla suspenze převedena do kolonky a sorbent byl promýván destilovanou vodou až do negativní reakce, kterou byla sledována přítomnost glutaraldehydu v jednotlivých promývkách. Po vymytí volného glutaraldehydu byl sorbent promyt 200 ml 50 mM fosfátového pufru, který má pH 7,2. Takto připravený sorbent byl převeden do 50 mM fosfátového pufru, který obsahoval 10⁶ permeabilizovaných buněk *Kluyveromyces lactis* na 100 ml sorbentu. Z hlediska přechodu beta-galaktosidasové aktivity na nosič a její stability bylo konstatováno, že imobilizace buněk byla v podmínkách míchané suspenze dokončena při teplotě 20 °C, přibližně za 6 hodin. Lokalizace buněk na povrchu nosiče byla sledována mikrofotograficky.

Permeabilizace imobilizovaných buněk je nutnou podmínkou využití jejich intracelulární enzymatické aktivity. Za tím účelem byla provedena permeabilizace buněk následujícím způsobem: Buněčná suspenze byla po 0,1 ml nanášena na střed membránového filtru, přičemž každé následující nanesení bylo provedeno vždy po úplném odsátí média. Po nanesení 1 ml objemu byly filtry přeneseny na skleněnou desku a zachycené buňky byly vystaveny účinku proudu teplého vzduchu o konstantní teplotě 60 °C po dobu 70 sekund. Permeabilizované buňky byly z povrchu filtrů smyty 0,05 M fosfátovým pufrům, který měl pH 7,0.

P ř í k l a d 2

Příprava zakotvených permeabilizovaných buněk byla provedena způsobem popsaným v příkladu 1 s tím rozdílem, že bylo použito buněk permeabilizovaných dimetylsulfoxidem. Suspenze buněk v 0,05 M fosfátovém pufru majícím pH 7,0 byla vystavena účinku 40 % dimetylsulfoxidu

při teplotě 20 °C. Po 30minutovém kontaktu byly buňky promyty, resuspendovány v uvedeném pufu a imobilizovány.

P ř í k l a d 3

Příprava imobilizovaných permeabilizovaných buněk byla provedena způsobem popsaným v příkladu 1 s tím rozdílem, že bylo použito jako nosiče polyetyléntereftalát o měrném povrchu 80 m²/g a průměrné velikosti částic 0,25 mm a buněk *Torulopsis casei*. Permeabilizace buněk byla provedena účinkem toluenu a etanolu. K 5 ml vytemperované suspenze buněk při 37 °C bylo přidáno 0,5 ml směsi toluenu a etanolu (1:3). Po 7minutovém míchání byly buňky promyty použitým pufem a imobilizovány.

P ř í k l a d 4

Postupem uvedeným v příkladu 1 byly imobilizovány nepermeabilizované buňky (*Fabospora fragilis*) na alkalickém poly-6-kaprolaktamovém sorbentu o povrchu 12 m²/g a velikosti částic 0,5 mm. Takto imobilizované buňky byly dodatečně permeabilizovány postupem uvedeným v příkladu 2 s tím rozdílem, že bylo použito suspenze nosiče s navázanými buňkami. Suspenze imobilizovaných buněk byla převedena do 1% roztoku glutaraldehydu, jehož sekundárním účinkem bylo dosaženo po 30 minutách zesítnění buněk.

P ř í k l a d 5

Postupem uvedeným v příkladu 1 byly imobilizovány buňky *Saccharomyces lactis* na polykondenzačním sorbentu melaminu s formaldehydem o měrném povrchu 200 m²/g a velikosti částic 0,45 mm. Permeabilizace buněk byla provedena ve směsi toluenu a etanolu 1:3 po dobu 7 minut. Potom buňky byly promyty použitým pufem a imobilizovány popsaným postupem.

P ř í k l a d 6

K imobilizaci buněk (*Candida pseudotropicalis*) byl použit sorbent na bázi blokového kopolymeru polyetylénoxid-kaprolaktam o celkovém měrném povrchu 8 m²/g a průměrné velikosti částic 1 mm. Postup imobilizace je popsán u příkladu 1 s tím rozdílem, že permeabilizace buněk byla provedena dimetylsulfoxidem tímto postupem: suspenze buněk v 0,05 M fosfátovém pufu, který má pH 7,0 byla vystavena účinku 40 % dimetylsulfoxidu při teplotě 20 °C. Po 30minutovém působení byly buňky promyty, resuspendovány v uvedeném pufu a použity k imobilizaci.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Imobilizované kvasinkové buňky vázané na nosič vyznačující se tím, že buňky jsou vázané na nosič, který je tvořen polymerní látkou, například na bázi polyetyléntereftalátu, polykaprolaktamu, polyfenylenoxidu, blokového kopolymeru polyetylénoxid-polykaprolaktam, melaminoformaldehydové pryskyřice, s mikroporézní strukturou o specifickém povrchu 1 až 700 m²/g.

2. Způsob přípravy imobilizovaných kvasinkových buněk podle bodu 1 vyznačující se tím, že se na polymerní nosič nejprve sorbuje síťovací činidlo, například glutaraldehyd, a pak se vzniklý produkt nechá reagovat s buňkami.

3. Způsob podle bodu 2, vyznačující se tím, že se na polymerní nosič adsorbuje glutaraldehyd a na vzniklou kompozici se vážou celé kvasinkové buňky a znovu zesítují glutaraldehydem.

4. Způsob podle bodů 2 a 3 vyznačující se tím, že se imobilizace buněk provádí při teplotě 4 až 30 °C a pH prostředí od 4 do 7,5 po dobu 1 až 48 hodin.

5. Způsob podle bodů 2, 3 a 4 vyznačující se tím, že kvasinkové buňky se permeabilizují.