POLSKA RZECZPOSPOLITA LUDOWA

URZĄD PATENTOWY PRL

OPIS PATENTOWY 101051

Patent dodatkowy
do patentu nr ————

Zgłoszono: 02.12.76 (P. 194148)

Pierwszeństwo: ————

Zgłoszenie ogłoszono: 26.09.77

Opis patentowy opublikowano: **30.11.1981**

Int. Cl[2]. C12K 1/08

Int. Cl[3]. C12N 11/04

CZYTELNIA
Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Twórcy wynalazku: Alicja Mika-Gibała, Antoni Siewiński, Tomasz Winnicki
Uprawniony z patentu: Politechnika Wrocławska,
Wrocław (Polska)

Sposób immobilizacji mikroorganizmów dla procesów transformacji mikrobiologicznej związków chemicznych

Przedmiotem wynalazku jest sposób immobilizacji mikroorganizmów dla procesów transformacji mikrobiologicznej związków chemicznych, znajdujący zastosowanie np. w chemii, biochemii, medycynie, analityce, przemyśle farmaceutycznym i spożywczym oraz inżynierii ochrony środowiska.

Procesy mikrobiologicznych transformacji związków chemicznych polegają na wykorzystaniu układów enzymatycznych, zawartych w komórkach określonych gatunków mikroorganizmów do przekształceń chemicznych. Reakcje te odznaczają się wysoką stereospecyficznością i selektywnością. Immobilizacja mikroorganizmów w nierozpuszczalnym w wodzie nośniku jest jedną z metod, podnoszących sprawność transformacji.

Znany jest sposób immobilizacji mikroorganizmów w usieciowanym żelu, opisany w publikacji: K. Mosbach, P.O. Larson: Preparation and Application of Polymer-Entrapped Enzymes and Microorganisms in Microbial Transformation Processes with special Reference to Steroid 11-β-hydroxylation and Δ^1-Dehydrogenation, Biotechnology and Bioengineering, 22,19–27, 1970. Według tego sposobu wilgotną grzybnię rozdrabnia się i sporządza jej wodną zawiesinę, w której znajduje się monomer w postaci akryloamidu, środek sieciujący w postaci, N,N'-metyleno-bis-akryloamidu i katalizatory w postaci nadsiarczanu amonowego i N,N,N',N'-czterometylenodwuaminy. Następnie prowadzi się proces polimeryzacji zawiesiny w temperaturze 288 K w ciągu jednej godziny, przepuszczając pęcherzyki azotu przez zawiesinę. W wyniku reakcji uzyskuje się usieciowiany żel poliakryloamidu, który następnie przetłacza się przez odpowiednie sito w celu uzyskania granulek. Z kolei granulki przemywa się przez czas około 10 godzin roztworem chlorku sodowego z roztworem buforowym, utrzymującym stałe pH odpowiednie dla rodzaju danej grzybni.

Tak uzyskany produkt, w którym nastąpiła immobilizacja grzybni w żelu polimerowym, stosuje się do transformacji związków chemicznych, polegającej na sporządzeniu zawiesiny granulek żelu w środowisku reagentów. Reakcja transformacji przy użyciu mikroorganizmów, uwięzionych w żelu polimerycznym, przebiega stosunkowo wolno, z powodu znacznych oporów dyfuzji substratów i produktów do wnętrza matrycy żelowej.

Przedmiotem wynalazku jest sposób immobilizacji mikroorganizmów dla procesów transformacji mikrobio-

logicznej związków chemicznych, w którym sporządza się płynną zawiesinę żywych komórek mikroorganizmów.

Istotę wynalazku stanowi to, że zawiesinę tę wprowadza się przez filtrację do stałego porowatego materiału, chemicznie i biologicznie obojętnego w stosunku do stosowanych substratów, otrzymanych produktów i mikroorganizmów, przy czym średnicę porów dobiera się tak, aby była minimalnie większa od najmniejszego liniowego wymiaru komórki mikroorganizmu. Korzystne jest stosowanie spiekanego polimeru termoplastycznego jako materiału porowatego.

Tak przeprowadzona immobilizacja umożliwia prowadzenie procesów transformacji w warunkach statycznych lub dynamicznych w sposób ciągły, przy maksymalnym kontakcie z roztworem transformowanego substratu. Łatwość wprowadzania mikroorganizmów do substancji porowatej usprawnia technologię immobilizacji. Łatwe jest także formowanie i spiekanie polimerów np. termoplastycznych w postaci różnorodnych kształtek, co pozwala na budowę biochemicznie czynnych modułów, pracujących jako bardzo sprawne układy o dużej aktywności i trwałości. Ten sposób immobilizacji mikroorganizmów umożliwia ponadto ich reaktywację przez okresowe podawanie pożywki oraz regenerację materiału polimerycznego przez usuwanie nieaktywnych komórek i wprowadzanie na to miejsce nowych.

Złoża przygotowane sposobem według wynalazku, zdolne są do prowadzenia na nich transformacji mikrobiologicznej zależnie od zastosowanego mikroorganizmu, to jest jego zawartości enzymatycznej. W przypadku stosowania np. bakterii Gluconobacter melanogenus możliwa jest transformacja L-sorbozy do L-sorbozonu; bakterii Pseudomonas pulida-transformacja L-argininy do L-cytruliny, bakterii Achromobacter liquidum-transformacja L-histydyny do kwasu urokaninowego. Przy stosowaniu np. grzybów Aspergillus oryzae możliwa jest hydroliza DL-tryptofanu, a np. przy stosowaniu drożdży Rhodotorulla mucilaginosa-transformacja acetofenonu do 1-fenyloetanolu, albo transformacja aldehydu benzoesowego do alkoholu benzylowego. Różnorodność transformacji zależna jest od doboru stosowanego rodzaju mikroorganizmu.

Przedmiot wynalazku jest przedstawiony w przykładzie wykonania. Przykładowy sposób, zgodny z wynalazkiem, jest przeznaczony do przeprowadzenia immobilizacji komórek drożdży, zawierających oksydoreduktazę, zdolną do transformacji między innymi aldehydu benzoesowego do alkoholu benzylowego. Najpierw przystępuje się do wytworzenia krążka porowatego polichlorku winylu przez spiekanie proszku polichlorku winylu emulsyjnego w temperaturze 453 ±5K w czasie 30 minut, uzyskując materiał o porowatości 34,8% i przeciętnej średnicy porów 7,5 μm. Otrzymuje się w ten sposób porowatość zdolną do zatrzymania komórek drożdży o wymiarach od 3 do 6 μm. Następnie sporządza się zawiesinę, zawierającą od 0,3 do 0,5 g/dm^3 komórek drożdży w przeliczeniu na suchą masę, którą to zawiesinę dwukrotnie filtruje się przez krążek porowatego polichlorku winylu. Filtrację prowadzi się pod ciśnieniem 50 do 70 kN/m^2, uzyskując całkowite zatrzymanie komórek drożdży w porach spieku i klarowny bezbarwny filtrat. Przy tak prowadzonej immobilizacji objętość żywych komórek drożdży stanowi około 54% objętości porów spieku.

Przygotowane złoże z immobilizowanymi komórkami drożdży zdolne jest do prowadzenia na nim transformacji np. aldehydu benzoesowego do alkoholu benzylowego przez umieszczenie tego złoża w roztworze aldehydu benzoesowego lub do dynamicznej transformacji np. tego związku drogą ciągłego przepuszczania aldehydu benzoesowego w postaci roztworu, najlepiej o składzie, zawierającym 200 mg/dm^3 aldehydu, rozpuszczonego w około 10 cm^3 dwumetyloformamidu i uzupełnionego buforem fosforanowym o pH = 6,2. W przypadku przepuszczenia przez złoże opisanego roztworu z prędkością $1,5 \times 10^{-2}$ mm/s uzyskuje się 100% transformacji aldehydu benzoesowego do alkoholu benzylowego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób immobilizacji mikroorganizmów dla procesów transformacji mikrobiologicznej związków chemicznych, w którym sporządza się płynną zawiesinę żywych komórek mikroorganizmów, znamienny tym, że zawiesinę tą wprowadza się przez filtrację do stałego porowatego materiału, chemicznie i biologicznie obojętnego w stosunku do stosowanych substratów, otrzymanych produktów i mikroorganizmów, przy czym średnicę porów dobiera się tak, aby była minimalnie większa od najmniejszego liniowego wymiaru komórki mikroorganizmu.

2. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że jako materiału porowatego używa się spiekanego polimeru termoplastycznego.

Prac. Poligraf. UP PRL nakład 120+18
Cena 45 zł