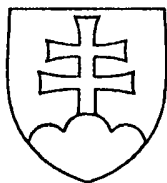


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

(21) Číslo dokumentu:

2681-92

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. 6:

C 12 N 11/04,
C 12 N 11/08

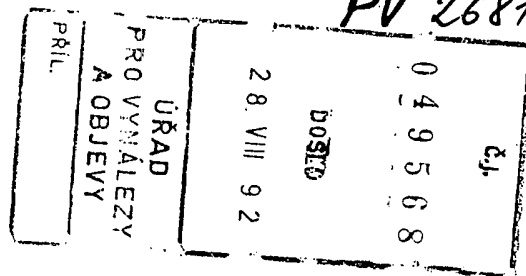
(22) Dátum podania: 28.08.92
(31) Číslo prioritnej prihlášky:
(32) Dátum priority:
(33) Krajina priority:
(43) Dátum zverejnenia: 08.02.95
(86) Číslo PCT:

(71) Prihlasovateľ: Biotika a.s., Slovenská Lupča, SK;

(72) Pôvodca vynálezu: Micháľková Eva Ing., CSc., Banská Bystrica, SK;
Welwardová Alica Ing., Bratislava, SK;
Jakubová Antónia Ing., Banská Bystrica, SK;
Gemeiner Peter Ing., CSc., Bratislava, SK;
Welward Ladislav Ing., CSc., Banská Bystrica, SK;
Kliment Július Ing., CSc., Banská Bystrica, SK;
Galková Margita Ing., Banská Bystrica, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Spôsob prípravy polyakrylamidových katalyzátorov pre biotransformácie**

(57) Anotácia:
Spôsob prípravy katalyzátorov spočíva v imobilizácii biopolymérov, hlavne proteínov a enzýmov rôzneho stupňa čistoty, intaktných alebo dezintegrovaných buniek mikroorganizmov a ich zmesí, zachytením do polyakrylamidového gélu a imobilizácii zosietením v tomto géli. Tento účel sa dosiahne tým, že 100 hmotnostných dielov aktívnych biopolymérov alebo buniek s obsahom sušiny 1 - 60 % hmotn. sa zmieša s 0,5 až 5 hmotn. dielmi vodného roztoku monoméru, zloženého z vodného roztoku akrylamidu a N, N' - metylénbisakrylamidu, s výhodou 50 % akrylamidu a 5 % N, N' - metylénbisakrylamidu. K zmesi sa za miešania pri teplote -3°C až 30 °C, s výhodou 0 až 10 °C, pridá 0,01 až 1, 0 hmotn. dielov bifunkčného sieťovacieho činidla, s výhodou 0,02 až 0,5 hmotn. dielov glutaraldehydu a ponechá sa reagovať 1 až 30 min. Potom sa zmes polymerizuje prídavkom persíranu a N, N, N', N' - tetrametyletyléndiamínu. Vzniknutý polyakrylamidový gél sa ďalej upraví na veľkosť častíc 0,1 až 1mm, premýva alebo ďalej zbavuje vody a ponecháva pred biotransformáciou napučiavať.



Spôsob prípravy polyakrylamidových katalyzátorov pre biotransformácie

Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu prípravy polyakrylamidových katalyzátorov pre biotransformácie, spočívajúci na imobilizácii aktívnych biopolymérov, hlavne proteínov a enzýmov rôzneho stupňa čistoty, natívnych alebo dezintegrovaných buniek mikroorganizmov a ich zmesí, zachytením do gélov a imobilizácii zosietením v polyakrylamidových géloch.

Takéto katalyzátory sú vhodné pre priemyselné biotransformácie, hlavne vo farmaceutickej a potravinárskej oblasti, napr. pri biotransformáciách antibiotík.

Doterajší stav techniky

Imobilizované bunky mikroorganizmov majú stále rastúcu aplikáciu aj v oblasti chemického priemyslu a pri dekontaminácii životného prostredia, ako to uvádza prehľad z rokov 1983 - 87 /M.P. Coughlan., P.J. Kiersten : J. Microb. Meth., 8, 1988, 51 - 90/.

Pri biotransformácii antibiotík, hlavne penicilínov a cefalosporínov, sa priemyselne aplikujú poly-(metakryl)glutaraldehydové a poly-glycidyl(metakrylové) biokatalyzátory /Murray Moo Young Ed.: Bioreactor Immobilised Enzymes and Cells - Fundamentals and Applications. Elsevier Applied Science, 1988/.

Pri imobilizácii penicilínacylázy na porézne polyakrylonitrilové vlákna sa ukázalo, že účinná je imobilizácia priamo na poréznom nosiči, ktorý má veľký vnútorný povrch / F. Ishimura a H. Seijo. J. Ferm. Technol. 71, /2/, 1991, 140/. Najvyššiu špecifickú aktivitu a výťažok imobilizácie, aj v porovnaní s inými metódami

prípravy, mal biokatalyzátor, v ktorom je enzým kovalentne viazaný na glutaraldehydom aktivované hydrogénované polyakrylonitrilové vlákna. V postupe imobilizácie purifikovanej penicilínacylázy v poréznych guľičkách polyakrylamidového gélu sa Ca-alginát-enzým-polyakrylamid suspenduje v roztoku glutaraldehydu s NaCl a po intermolekulovom zosietení proteínu Ca-alginát sa vyluhuje fosfátovým tlmiacim roztokom. Získajú sa rovnomerné sférické guľičky o priemere 1,5 - 2,0 mm bez difúznej limitácie /A.Prabhune, H.Sivaramen : Appl.Biochem. Biotechnol., 30, 1991, 265/.

Iný spôsob prípravy biokatalyzátorov je imobilizácia enzým-membránových komplexov, vytvorených väzbou enzýmu s bunkami /bunky E.coli a purifikovaná penicilínacyláza/ popisovaná v P.S.Nys et.al.: Dokl. Akad.Nauk SSSR, 315,4,1990,1000, /Biochim./. Takýto komplex imobilizovaný v polyakrylamidovom gély aktivitou a stabilitou prevyšuje imobilizované natívne bunky aj enzým.

Prípravu bunkových katalyzátorov pre biotransformácie, imobilizáciou buniek mikroorganizmov alebo rastlín, rôzneho stupňa integrity a permeabilizácie, chemicky reaktívnym vo vode rozpustným polymérom, vzniknutým reakciou polyetyléniminu a podobných aminorov s bifunkčnými aldehydmi dikarboxylových kyselín, ako je glutaraldehyd, popisuje patentový spis CS 231458.

Ďalšie československé postupy, závislé na horeuvedenom patente, stabilizujú a spevňujú častice biokatalyzátora, v princípe ďalším zosietením bunkových katalyzátorov glutaraldehydom a prípadne tiež s prídavnou bielkovinou z rôznych zdrojov a čistoty.

Takéto sú československé patenty 241730 pre transformáciu β -laktámových antibiotík, hlavne pre prípravu kyseliny 6-aminopenicilánovej a kyseliny 7-aminodeacetoxycefalosporánovej; CS 259997 pre imobilizáciu kvasiniek schopných transformovať penicilín V; CS patent 251111, pre hydrolýzu kyseliny 7- β -/4-karboxybutánamido-/cefalosporánovej bunkami *Pseudomonas species*.

Tieto postupy, nevhodné na imobilizovanie enzýmov, i keď ako nosiče využívajú bunkovú maticu, predstavujú niekoľkostupňové procesy / prípravu reaktívneho polyméru, vlastnú imobilizáciu a ďalšie spevnenie častíc /, vyžadujú nadbytok reaktantov a ďalších agens /aceton, etanol a pod./.

Špecifická enzýmová aktivita takto pripravených biokatalyzátorov je priamo závislá na aktivite buniek, ktorá má však svoje hranice. Tým je teda limitovaná aj koncentrácia vstupujúceho transformovaného substrátu a ekonomia procesu.

Takýmito postupmi pripravené biokatalyzátory majú malú mechanickú pevnosť a pružnosť, čo negatívne ovplyvňuje ich operačnú stabilitu a limituje technológie biotransformácií.

Podstata vynálezu

Nevýhody takýchto biokatalyzátorov a spôsob ich prípravy odstraňuje navrhovaný spôsob prípravy polyakrylamidových katalyzátorov pre biotransformácie, spočívajúci na imobilizácii biopolymérov hlavne proteínov a enzýmov rôzneho stupňa čistoty, natívnych /intaktných/ alebo dezintegrovaných buniek mikroorganizmov a ich zmesí, zachytením do gélu a imobilizácii zosietením v polyakrylamidových géloch.

Navrhovaný spôsob prípravy biokatalyzátorov sa vyznačuje tým, že k 10 hmotnostným dielom vodného roztoku alebo suspenzie, obsahujúcich 2 - 60 % hmotnostných aktívnych biopolymérov, hlavne enzýmov a proteínov, a/alebo buniek natívnych a/alebo dezintegrovaných buniek sa pridá 0,5 - 5 hmotnostných dielov vodného roztoku monoméru, zloženého z 15 - 60 % hmotnostných akrylamidu a 0,05 - 5 % hmotnostných sieťovacieho činidla, s výhodou 50 % akrylamidu a 5 % N,N'-metylénbisakrylamidu. K tejto zmesi sa po zhomogenizovaní pridá 0,01 - 1 hmotnostných dielov bifunkčného sieťovacieho reagentu, s výhodou 0,02 - 0,5 hmotnostných dielov glutaraldehydu, a zmes sa ponechá reagovať

1 - 30 min pri teplote -3 až 30°C , s výhodou pri 0 až 10°C . Potom sa reakčná sústava polymerizuje prídavkom iniciatora a akceleračného polymerizácie, s výhodou $0,07 - 0,20$ hmotnostných dielov persíranu amonného a N,N,N',N' -tetrametyletyléndiamínu. Vzniknutý zosietený polyakrylamidový katalyzátor sa upraví na veľkosť častíc $0,1 - 1,0$ μm a premýva sa. Častice sa môžu ďalej dosieť $0,01 - 1$ % vodným roztokom glutaraldehydu po dobu 10 až 120 min. Z takto upraveného, premytého a odseparovaného biokatalyzátora možno odstrániť vodu, sušením pri $10 - 40^{\circ}\text{C}$, kryoskopickým vymrazovaním a pod. Suchý biokatalyzátor sa pred použitím ponechá napučiavať vo vode resp. tlmivom roztoku pri $1 - 20^{\circ}\text{C}$ a po premytí sa vlhký použije do reakcie.

Výhodou navrhovaného spôsobu je jeho jednoduchosť, umožňujúca imobilizovať enzým i bunky a ich zmesi. Postup nevyžaduje špeciálnu úpravu komponent a reakčnej zmesi, reakcia imobilizácie prebieha za mierneho chladenia po krátku dobu a prakticky v jednom reaktore.

Takto vzniknutý polyakrylamidový biokatalyzátor nevyžaduje špeciálnu úpravu, je veľmi pružný a mechanicky stabilný. Možno ho zbaviť vody a skladovať v suchom stave.

Príklady prevedenia

Príklad 1

K 5 g / 3 g sušiny / roztoku technického enzýmu oxidázy D-aminokyselín (ďalej DAAO), aktívneho na cefalosporín C, o aktivite $0,27$ $\mu\text{kat/g}$ sušiny, sa za miešania a chladenia v ľadovom kúpeli pridalo $1,6$ g roztoku monomérov / 50% hmot. akrylamidu a 5% hmot. N,N' -metylenbisakrylamidu (ďalej BIS) vo vode /. Po 10 min. sa k zmesi pridalo $0,63$ g 25% vodného roztoku glutaraldehydu (ďalej GA) a zmes sa miešala pri teplote 5°C 5 min. Potom sa k zmesi pridalo $0,05$ g N,N,N',N' -tetrametyletyléndiamínu (ďalej TEMED) a $0,3$ ml 25% vodného roztoku persíranu amonného. Vzniknutý tuhý

gél sa dezintegroval pretláčaním cez sito o veľkosti otvorov 0,3 - 0,5 mm, dekantoval 5-krát 100 ml vody, odseparoval a na frite premyl 1 mol/dm³ roztokom chloridu sodného a 0,1 mol/dm³ fosfátového tlmivého roztoku. Získalo sa 6,9 g biokatalyzátora o o sušine 19,5 % hmotnostných a o aktivite 0,12 μ kat/g vlhkého katalyzátora.

Príklad 2

Postup ako v príklade 1 s tým rozdielom, že namiesto enzýmu DAAO sa použila zmes, 2,5 g / 0,5 g sušina/ vodného roztoku enzýmu DAAO z príkladu 1 a 2,5 g / 0,5 g sušiny/ vodnej suspenzie permeabilizovaných buniek kvasinky *Trigonopsis variabilis* CCY-15-1-2 o aktivite 0,1 μ kat/g suspenzie buniek a 0,95 ml 25% roztoku GA.

Pripravilo sa 7,1 g biokatalyzátora o aktivite 0,075 μ kat/g vlhký.

Príklad 3

Postup ako v príklade 1 s tým rozdielom, že namiesto enzýmu DAAO, sa použila suspenzia permeabilizovaných a dezintegrovaných buniek *Trigonopsis variabilis*, / 20 % sušina / o aktivite 0,07 μ kat/g suspenzie. Pripravilo sa 7,5 g biokatalyzátora, ktorý sa nechal voľne pri laboratórnej teplote vysušiť. Získalo sa 1,72 g suchého katalyzátora. Po troch mesiacoch skladovania pri 5°C sa suchý gel premyl 0,05 M fosfátovým tlmivým roztokom o pH 7,8 a po 16 hod. napučania vo vode pri teplote 5°C sa namerala aktivita 0,068 μ kat/g vlhk.

Príklad 4

Postup ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použila 10 %-ná suspenzia permeabilizovaných buniek *Trigonopsis variabilis* s aktivitou 50 nkat/g suspenzie, 2,5 g vodného roztoku monomeru, zloženého zo 60 % akrylamidu a 0,5 % BIS, a 0,94 g 25 %-ného vodného roztoku GA. Pripravilo sa 6 g biokatalyzátora s aktivitou 29 nkat/g gelu.

Príklad 5

Postup ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa imobilizovalo 5 g vodnej suspenzie /15 % sušina/ permeabilizovaných buniek *Pseudomonas* sp. CCM 3635, obsahujúcich hydrolázu kyseliny 7- β -/4-karboxybutánamido/cefalosporánovej s aktivitou nkat/g suspenzie. Pripravilo sa 7,2 g biokatalyzáta o aktivite 29 nkat/g vlh.biokatalyzátora.

Príklad 6

Tak ako v príklade 5 s tým rozdielom, že sa do reakcie použilo 1,25 ml 25 % vodného roztoku GA.V 6,9 g vlhkého gelu bola aktivita 192 nkat.

Príklad 7

Postupovalo sa ako v príklade 1, s tým rozdielom, že sa pracovalo s vodnou suspenziou permeabilizovaných buniek / sušina 9% / *Bacillus subtilis* CCM-220 s acetylésterázovou aktivitou na cefalosporín C.

Pripravilo sa 7,5 g biokatalyzátora s aktivitou 42 nkat/g vlh.katalyzátora.

Príklad 8

Tak ako v príklade 7, ale sa pridalo 0,1 g TEMED a 0,14 ml 25 % persíranu amonného. V 6,8 g vlhkého gelu bola aktivita 290 nkat.

Príklad 9

40 g vodnej suspenzie buniek / 12 % sušiny / *Escherichia coli*, s penicilín G amidázovou aktivitou 8,4 ukat/g suš., sa rozmiešalo s 12 ml roztoku monoméru / vodný roztok 50 % akrylamidu a 5 % BIS /, za chladenia na 0 - 10 °C. Do zhomogenizovaného roztoku sa za intenzívneho miešania pridalo 7,5 ml 25 % vodného roztoku GA a nechalo sa reagovať 10 min pri 5°C. Potom sa pridalo 0,3 g TEMED a 1,5 ml 25 % vod.roztoku persíranu amonného. V priebehu 5 min sa vytvoril tuhý gél. Tento sa upravil pretláčaním cez sito /priemer otvorov 0,5 mm/.

Vzniknuté valcovité častice biokatalyzátora sa dekantovali vodou do temer čirej a bezfarebnej odpadovej vody. Potom sa častice odfiltrovali, premyli vodou, 100 ml 1 mol/l vodného roztoku chloridu sodného a 0,1 mol/l fosfátového tlmivého roztoku pH 7,8 a na frite odsali. Pripravilo sa 56 g biokatalyzátora o aktivite 5,5 μ kat/g vlhkého.

Príklad 10

Postup ako v príklade 9, s tým rozdielom, že sa použila suspenzia buniek *Cryptococcus* sp. / 10% sušina / s penicilín V amidázovou aktivitou 2,58 μ kat/g sušiny. Na reakciu zosietenia sa použilo 0,53 ml 25 % vodného roztoku GA.

Získalo sa 55 g biokatalyzátora o aktivite 0,9 μ kat/g sušiny.

Príklad 11

Postup ako v príklade 9, s tým rozdielom, že sa pracovalo s parciálne purifikovaným enzýmom o aktivite 1,7 μ kat/g sušiny /sušina 5% / a do reakcie sa použilo 0,53 ml 25% vodného roztoku GA. Pripravilo sa 52 g biokatalyzátora s aktivitou 0,057 μ kat/g vlhkého.

Príklad 12

Postupovalo sa ako v príklade 1, s tým rozdielom, že sa použil vodný roztok technickej invertázy /sušina 5 % , aktivita 210 μ kat/g sušina. Pripravilo sa 6,3 g biokatalyzátora o aktivite 1,67 μ kat/g vlh.

Príklad 13

Postupovalo sa tak, ako v príklade 1, s tým rozdielom že sa pracovalo s vodným roztokom technickej amylázy / aktivita 0,67 μ kat/mg roztoku, sušina 15 % /. Získalo sa 6,75 g biokatalyzátora o aktivite 0,42 μ kat/mg vlhkej hmoty.

Príklad 14

Postup ako v príklade 9, s tým rozdielom, že častice polyakrylamidového katalyzátora sa suspendovali v 150 ml 0,3 % vodného roztoku GA a miešali 20 min. Potom sa častice odseparovali, premyli vodou a sušili kryoskopickým vymrazovaním. Pripravilo sa 11 g biokatalyzátora o aktivite 26,1 μ kat/g .

Priemyselná využiteľnosť

Polyakrylamidové katalyzátory, pripravené spôsobom podľa vynálezu, možno aplikovať vo farmaceutickej oblasti pri výrobe rôznych substancií, napr. pri biotransformácii antibiotík. Ich využiteľnosť siaha aj do oblasti potravinárskej a chemickej výroby.

Patentové nároky

Spôsob prípravy polyakrylamidových katalyzátorov pre biotransformácie vyznačujúci sa tým, že k 1,0 hmotnostným dielom vodného roztoku, alebo suspenzie, obsahujúcich 2 - 60 % hmotnostných aktívnych biopolymérov, hlavne enzýmov a proteínov, a /alebo intaktných buniek, a/alebo dezintegrovaných buniek, sa pridá 0,5 - 5 hmotnostných dielov vodného roztoku monoméru, zloženého z 15 - 60 % hmotnostných akrylamidu a 0,05 - 5 % hmotnostných sieťovacieho činidla, s výhodou 50 % akrylamidu a 5% N,N'-metylénbisakrylamidu, po zhomogenizovaní sa k zmesi pridá 0,01 - 1,0 hmotnostných dielov bifunkčného sieťovacieho reagentu, s výhodou 0,02 - 0,5 hmotnostných dielov glutaraldehydu, zmes sa ponechá reagovať pri teplote -3 až 30°C, s výhodou pri 0 - 10°C po dobu 1 až 30 minút, potom sa pridá 0,05 - 1,0 hmotnostných dielov iniciátora a akcelerátora polymerizácie, s výhodou 0,07 - 0,20 hmotnostných dielov persíranu amonného a N,N,N',N'-tetrametyletyléndiamínu, vzniknutý polyakrylamidový bio-katalyzátor sa upraví na veľkosť častíc 0,1 - 10 mm, suspenduje vo vode a/alebo v tlmivom roztoku a/alebo v 0,01 - 1 % roztoku glutaraldehydu vo vode, alebo v tlmivom roztoku 10 - 120 min., separuje, premýva a/alebo ďalej zbaví vody a potom ponechá napučiavať vo vode, alebo v tlmivom roztoku pri teplote 1 - 20 °C.