

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **03.06.2005**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.02.2007**
(Věstník č. 7/2007)

(21) Číslo dokumentu:

2005-352

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

A62D 3/00	(2006.01)
B09C 1/10	(2006.01)
C02F 3/34	(2006.01)
C02F 11/00	(2006.01)
C02F 11/02	(2006.01)
C02F 101/36	(2006.01)

(71) Přihlašovatel:

Masarykova univerzita v Brně, Brno, CZ

(72) Původce:

Prokop Zbyněk, Brno, CZ
Damborský Jiří, Brno, CZ
Opluštil František, Brno, CZ
Jesenská Andrea, Brno, CZ
Nagata Yuji, Sendai, JP

(74) Zástupce:

Dadej, Gheorghiu, Kendereški - patentová a právní
kancelář, Ing. Mihnea Gheorghiu, CSc., Lidická 51,
Brno, 60200

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Způsob detoxikace sulfidického yperitu
působením halogenalkandehalogenáz**

(57) Anotace:

Způsob detoxikace sulfidického yperitu působením halogenalkandehalogenáz nebo jejich směsí, způsob přípravy dehalogenujících enzymů a dekontaminačních směsí, obsahujících jako chemicky aktivní komponentu alespoň jednu divokou a/nebo modifikovanou halogenalkandehalogenázu (EC 3.8.1.5). Vhodnými dehalogenázami jsou DhaA z *Rhodococcus rodochrous* NCIMB 13064, DmbA z *Mycobacterium bovis* 5033/66 nebo LinB ze *Sphingomonas paucimobilis* UT26. Dekontaminace je použitelná k detoxikaci sulfidického yperitu na površích techniky, stavebních objektů, kůže osob či zvířat a složek životního prostředí, kdy se na sulfidický yperit působí dekontaminační směsí s koncentrací enzymu v rozmezí 1×10^{-6} - 1×10^0 mol.l⁻¹ při teplotě +10 °C až +70 °C, s výhodou při +40 °C a pH = 4 až 12.

Způsob detoxikace sulfidického yperitu působením halogenalkandehalogenáz

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu detoxikace sulfidického yperitu působením halogenalkandehalogenáz (kódové číslo enzymu EC 3.8.1.5), jako základní, chemicky aktivní komponenty dekontaminačních směsí. Dekontaminační směsi jsou určeny k detoxikaci sulfidického yperitu (2,2'-dichlordiethylsulfidu) na površích vojenské techniky, přepravní, průmyslové a zemědělské techniky, technických zařízení a stavebních objektů (dále jen techniky), kůže osob či zvířat a složek životního prostředí (voda, půda, sedimenty a vzduch), které jsou kontaminovány touto vysoce toxickou zpuchýřující látkou.

Stav techniky

V současné době se v jednotkách armád, civilní ochrany a hasičských a záchranných sborů využívají dekontaminační směsi, které se zpravidla vyznačují nežádoucí materiálovou agresivitou a vysokou jednotkovou spotřebou, neboť jejich chemicky aktivními komponentami jsou stechiometrická činidla, která se při reakci se sulfidickým yperitem postupně spotřebovávají. Jejich praktické využití na technice způsobuje korozní znehodnocení detoxikovaného materiálu či povrchů a pokud se směsi dostanou do půd či vod, ohrožují i životní prostředí.

V literatuře byly popsány enzymy, které vykazují detoxikační aktivitu vůči vysoce toxickým fosfor organickým (nervovým) látkám, nazývané jako organofosfátové hydrolázy, OPA anhydrazý či DFPázy. Jako jediný příklad biologické detoxikace zpuchýřujícího sulfidického yperitu, 2,2'-dichlordiethylsulfidu, bylo až dosud v literatuře uváděno použití bakteriálního kmenu *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 (ATCC 53968), který je schopen využívat chemický analog yperitu 2-chlorethyl-ethylsufid jako jediný zdroj uhlíku pro svůj růst [Kilbane, J. J., and Jackowski, K. (1996) *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 65, 370-374]. Detoxikační účinek bakteriálního kmenu *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 (ATCC 53968) je založen na štěpení vazby C-S v molekule 2-chlorethyl-ethylsufidu. Byly publikovány i aplikace enzymu štěpícího vazbu C-S v netoxickém hydrolytickém produktu, thiodiglykolu [Harvey, S., DeFrank, J. J., Valdes, J. J., Kamely, D, and Chakrabarty, A. M., (1990) *Proceedings: Biotechnology-Biodegradation Workshop Symposium by US Army Research Office*, 47-58; Kilbane, J. J., (1990) *Resources Conserv. and Recycl.* 3, 69-79].

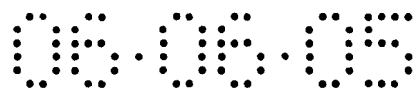
Halogenalkandehalogenázy jsou enzymy schopné odstranit halogen z halogenované alifatické sloučeniny hydrolytickou substitucí a vytvoření příslušných alkoholů [Janssen, D. B. Pries, F.,

a Van der Ploeg, J. R. (1994) *Annual Review of Microbiology* 48, 163-191]. Hydrolytická dehalogenace pokračuje formální nukleofilní substitucí atomu halogenu za hydroxylový iont. Strukturně patří halogenalkandehalogenázy do rodiny α/β -hydroláz [Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G., and Goldman, A. (1992) *Protein Engineering* 5, 197-211]. Halogenalkandehalogenázy obsahují ve své struktuře nukleofilní rameno [Damborsky, J. (1998) *Pure and Applied Chemistry* 70, 1375-1383], které je jedním z nejvíce konzervovaných strukturních prvků α/β -hydroláz. Další vysoce konzervovanou strukturou je centrální β -skládaný list, který je po obou stranách obklopen α -šroubovicemi, tvořící hydrofobní jádro hlavní domény. Hlavní doména nese katalytickou triádu: kyselinu asparagovou – histidin – kyselinu asparagovou/glutamovou. Druhá doména, která je tvořena výhradně α -šroubovicemi leží na hlavní doméně. Rozhraní mezi hlavní a víčkovou doménou tvoří aktivní centrum enzymu. Zatímco je mezi hlavními doménami vysoká podobnost, sekvence a struktura víčkové domény se mezi jednotlivými halogenalkandehalogenázami významně liší. Předpokládá se, že vlastnosti a struktura víčkové domény určuje zásadně substrátovou specifitu [Pries, F., Van den Wijngaard, A. J., Bos, R., Pentenga, M., and Janssen, D. B. (1994) *Journal of Biological Chemistry* 269, 17490-17494; Kmunicek, J., Luengo, S., Gago, F., Ortiz, A. R., Wade, R. C., and Damborsky, J. (2001) *Biochemistry* 40, 8905-8917].

Podstata vynálezu

Způsobem podle vynálezu jsou uvedené nedostatky existujících dekontaminačních směsí obsahující stechiometrická činidla do značné míry překonány přípravky, které obsahují katalyzátor hydrolytické detoxikace sulfidického yperitu, což je enzym nebo směs enzymů halogenalkandehalogenáz (EC 3.8.1.5). Základní a podstatnou komponentou těchto směsí je přítomnost alespoň jednoho z enzymů halogenalkandehalogenáz. Obecně tato metoda zahrnuje hydrolytickou dehalogenaci sulfidického yperitu tak, že se na yperit působí dekontaminační směsí obsahující jeden nebo více divokých nebo modifikovaných halogenalkandehalogenáz, které sulfidický yperit přemění na netoxický produkt thiodiglycol.

Halogenalkandehalogenáza je exprimována v přirozeném producentu nebo v heterologním hostitelském organismu např. v bakteriích *Escherichia coli* nebo v kvasince *Pichia pastoris*. Používá se enzym obsažený v živých nebo v mrtvých buňkách, ve formě hrubého buněčného extraktu nebo ve formě purifikovaného proteinu. Jako enzym pro dehalogenační směs se použije alespoň jedna halogenalkandehalogenáza vybraná ze skupiny enzymů s kódovým číslem



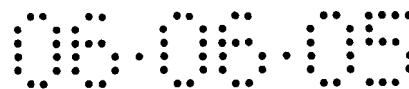
EC 3.8.1.5, např. halogenalkandehalogenáza DhaA z *Rhodococcus rodochrous* NCIMB 13064, DmbA z *Mycobacterium bovis* 5033/66 nebo LinB ze *Sphingomonas paucimobilis* UT26.

Halogenalkandehalogenázy tvoří důležitou skupinu enzymů, které mají schopnost štěpit vazbu mezi halogenem a uhlíkem alifatických halogenovaných sloučenin. Mají širokou substrátovou specifitu zahrnující halogenované alkany, cykloalkany, alkeny, ethery a alkoholy. Mechanismus dehalogenace spočívá v nukleofilním napadení uhlíku, nesoucím halogenový substituent, za odštěpení halogenidového iontu a současné tvorbě alkylenzymového intermediátu. Vzniklý intermediát je následně hydrolyzován za vzniku odpovídajícího alkoholu, halogenidového iontu a protonu. Enzymem halogenalkandehalogenázou je sulfidický yperit hydrolyticky dehalogenován na netoxický bis(2-hydroxyethyl)sulfid.

V dekontaminačních směsích se halogenalkandehalogenáza nachází v surovém nebo čištěném extraktu, imobilizovaná na materiálu nosiče, volná ve vodném roztoku, v jednofázovém organickém nebo vodném roztoku nebo v dvojfázovém systému tvořeném organickou a vodnou fází. Enzymy mohou být imobilizovány adsorpcí na anorganickém nebo organickém materiálu nosiče (jako je Celite, aktivované uhlí, oxidy hliníku, celulóza, syntetické pryskyřice, sephadex) nebo kovalentním připojením na povrch organického materiálu (jako je celulóza, dextran, škrob, chitin, agaróza), anorganického materiálu (jako je porézní sklo), nebo syntetického polymerního materiálu nosiče (jako je VA-Epoxy Biosynth, Eupergit).

Enzym halogenalkandehalogenáza může být rozpustný, krystalický, lyofilizovaný nebo vysrážený. Enzym může být uzavřen do vymezené oblasti, kde zůstává katalyticky aktivní – uzavřený do pevné matrice nebo do membránou ohraničených oblastí. Enzymy mohou být uzavřeny do biologické matrice, např. agarového gelu, alginátového gelu a k-karagenanu. Enzym může být uzavřen také do anorganických stabilních matic, např. silikagelu. Těsná síť, která má schopnost nést izolovaný enzym, může být získána polymerací syntetických monomerů, např. polyakrylamidu, v přítomnosti enzymu. V závislosti na způsobu imobilizace mohou být významně ovlivněny vlastnosti enzymu, jako jsou katalytická rychlost, vazebná afinita a stabilita. Enzymaticky katalyzovaná hydrolytická detoxikace sulfidického yperitu se může uskutečňovat v rozmezí teplot od +10 do +70 °C s reakčním optimem při +40 °C.

Doplňkovými komponentami jsou vodné roztoky pufrů (např., fosfátový pufr, tris-síranový pufr, glycinový pufr, acetátový pufr nebo citrátový pufr), které stabilizují neutrální hodnotu pH prostředí v optimálním intervalu 7,0 až 8,5. Profil aktivity v závislosti na hodnotě pH je širší a umožňuje rozmezí pH od 4 do 12 při udržení dostatečné aktivity. Dalšími doplňkovými komponentami jsou povrchově aktivní látky či organická rozpouštědla, které usnadňují rozpouštění sulfidického yperitu ve vodných prostředích. Přidávky organických rozpouštědel mísitelných s vodou, jako jsou metanol, terciální butanol, aceton, dioxan, acetonitril,



dimethylformamid, dimethylsulfoxid, tetrahydrofuran, 3-methyl-3-pentanol a pyridin, mohou dosahovat až koncentrace 70 % celkového objemu v závislosti na stabilitě enzymu.

Dekontaminační směsi na bázi halogenalkandehalogenáz mohou sestávat ze dvou makroskopických fází, jmenovitě z vodné fáze obsahující rozpuštěný enzym a z druhé fáze, kterou jsou ve vodě nerozpustná nebo částečně rozpustná organická rozpouštědla, jako jsou ethylacetát, diethylether, methyl terc-butylether, cyklohexanol, n-propylacetát, ethylchloracetát, bis(2-chlorethyl)ether, isopropylacetát, butylacetát, isobutylacetát, hexanol, isoamylacetát, n-amylacetát, toluen, oktanol, isoheptan, n-butylether, cyklohexan, 2-methylpentan, n-hexan, methylcyklohexan a n-oktan. Organická fáze zvyšuje rozpustnost yperitu v dekontaminační směsi, který přechází do vodné fáze. Reakce probíhá ve vodné fázi, kde je enzym v přirozeném prostředí a není v přímém styku s organickým rozpouštědlem, ve kterém se nachází většina rozpuštěného yperitu. Urychlení přenosu reaktantu a produktu mezi oběma fázemi, reaktantu k enzymu a produktu od enzymu, může být dosaženo zvýšením mezifázového povrchu (vytvořením jemné disperze) nebo mícháním. Velké množství vody může být nahrazeno organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou. Enzym je potom suspendován v jednofázovém organickém rozpouštědle. Optimální katalytická aktivita enzymu v organickém rozpouštědle může být dosažena úpravou a udržováním obsahu vody. Toho lze běžně dosáhnout pomocí páru sůl/hydrát, např. $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}/2 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{NaI bezv.}/2 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \text{ bezv.}/2 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{NaOAc bezv.}/3 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{NaBr bezv.}/2 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \text{ bezv.}/7 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}/7 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \text{ bezv.}/10 \text{ H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}/12 \text{ H}_2\text{O}$, které se přidají k rozpouštědlu a fungují jako stabilizátor obsahu vody. Rozpustnost enzymu v lipofilních organických rozpouštědlech může být modifikována kovalentním připojením amfipatického polymeru polyethylenglykolu k povrchu enzymu. Vazba polymerního řetězce k povrchu enzymu je dosažena reakcí ϵ -amino skupin lysinových zbytků se „spojovníkem“, např. chloridem kyseliny kyanurové. Stabilizátory proteinů, jako jsou polyalkoholy, např. cukerné alkoholy nebo glycerol, inaktivní proteiny, jako je bovinní sérový albumin, nebo polymery, které mají určitou strukturní podobnost s vodou, např. polyethylenglykol, polyvinylalkohol, mohou být přidány do reakčního média, aby zvýšily stabilitu enzymu.

Halogenalkandehalogenázy použité podle tohoto vynálezu mohou být dodatečně vyvíjeny pomocí racionálního designu, který je založen na strukturní analýze, např. proteinové krystalografii, nukleární magnetické rezonanci a spektroskopii cirkulárního dichroismu; a biochemické charakterizaci, např. kinetice rovnovážného stavu, kinetice přechodného stavu, rozborech stability a termostability, spektroskopických rozborech a podobně, pomocí následného počítačového modelování, např. srovnávání sekvencí, fylogenetických analýz, homologního modelování, molekulárního dokování, molekulární mechaniky, molekulární dynamiky, kvantové mechaniky a statistiky s mnoha proměnnými, a mutageneze DNA, např.

kazetové mutagenese, místně cílené mutagenese, chemické mutagenese, chybující PCR, místně saturační mutagenese, mutagenese souboru, opakovatelné mutagenese souboru, skenovací saturační mutagenese, použití mutátorových kmenů, atd. Postup zahrnuje změnu alespoň jednoho aminokyselinového zbytku v halogenalkandehalogenáze za jiný aminokyselinový zbytek nebo rekombinaci dvou nebo více členů halogenalkandehalogenáz, aby byla získána modifikovaná halogenalkandehalogenáza se zlepšenou účinností. Modifikované nukleové kyseliny mohou být vpraveny do buňky, v níž mohou být exprimovány, aby poskytly modifikovanou halogenalkandehalogenázu.

Výhodou dekontaminační směsi s obsahem halogenalkandehalogenáz je, že:

- a) s požadovanou účinností detoxikuje sulfidický yperit, který je homogenně rozpuštěn ve vodných prostředích s hodnotou pH v rozmezí od 4 do 12 (s optimem v neutrální oblasti pH 7,0 až 8,5) v rozmezí teplot od +0 do +70 °C s reakčním optimem při +40 °C,
- b) k použití postačuje nízká počáteční koncentrace (řádově od 1×10^{-6} mol.l⁻¹) pro dosažení požadované rychlosti reakce, tj. dostatečného stupně detoxikace v průběhu cca 15 až 30 minut, přičemž horní mez koncentrace enzymu se nachází přibližně při 1×10^0 mol.l⁻¹,
- c) vykazuje katalytický účinek, tj. při detoxikační reakci se nespotřebovává, což přináší úspory v oblasti logistiky,
- d) nevykazuje chemickou agresivitu vůči běžným konstrukčním materiálům a komponentám techniky, které odolávají působení neutrálních vodných, korozně neagresivních, dekontaminačních směsí (vodných roztoků, pěn, emulsí či mikroemulsí),
- e) nevykazuje žádnou toxicitu a je volně rozložitelný v životním prostředí.

Příklady provedení

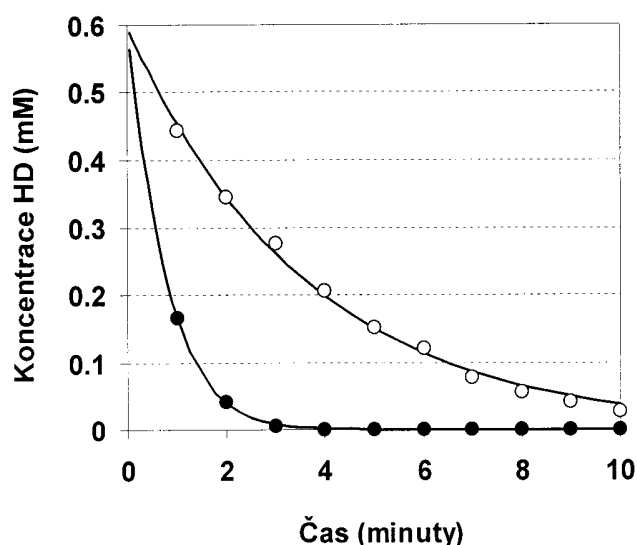
Enzym se připravuje homologní expresí v původním organismu nebo heterologní expresí v hostitelském organismu, např. v bakteriích *Escherichia coli* nebo v kvasince *Pichia pastoris*. Podle vynálezu se používá enzym obsažený v živých nebo v mrtvých buňkách, ve formě hrubého buněčného extraktu nebo ve formě purifikovaného proteinu.

Příklad 1

Pro nadprodukci enzymu halogenalkandehalogenázy LinB ze *Sphingomonas paucimobilis* UT26 (Sekvence 1) se naklonuje odpovídající gen v expresním vektoru pPICZαA.

Naklonované plasmidy jsou transformovány do *Pichia pastoris* GS115. *Pichia pastoris* GS115 je kultivována při teplotě 28 °C v růstovém médium (1 % hmot. kvasničního extraktu, 2 % hmot. peptonu, 4×10^{-5} % hmot. Biotinu a 1 % hmot. kyseliny kasaminové ve 100 mM draselnofosfátovém pufru, pH 6,5). Indukce enzymové syntézy je iniciována přidáním 0,7 % obj. metanolu, kdy kultura dosáhne optické hustoty 2 při 600 nm. Po indukci je kultura inkubována 10 h při teplotě 28 °C a pak sklizena. Síran amonný je přidán do supernatantu tak aby koncentrace dosáhla 75 % saturace. Roztok je míchán 30 minut, až je všechen přidáný síran amonný rozpuštěn. Supernatant je centrifugován při 11 000 g po dobu 15 minut. Pelet je následně rozsuspendován ve 20 mM draselnofosfátovém pufru, pH 7,5, s obsahem 0,5 M chloridu sodného a 10 mM imidazolu. Halogenalkandehalogenáza je následně čištěna na Ni-NTA Sefarózové koloně HR 16/10 (Qiagen, Německo). Halogenalkandehalogenáza s histidinovou kotvou se naváže na pryskyřici umístěnou v pufru udržujícím rovnováhu, který obsahuje 20 mM draselnofosfátového pufru o pH 7,5; 0,5 M chloridu sodného a 10 mM imidazolu. Nevázané a slabě navázané proteiny jsou vymyty puftrem obsahujícím 60 mM imidazolu. Enzym LinB s histidinovou kotvou je potom vymyt puftrem obsahujícím 160 mM imidazolu. Aktivní frakce jsou dialyzovány přes noc proti 50 mM draselnofosfátovému pufru, pH = 7,5. Enzym je skladován při teplotě 4 °C v 50 mM draselnofosfátovém pufru, pH = 7,5 s obsahem 10 % glycerolu a 1 mM 2-merkaptioetanolu zvyšující dlouhodobou stabilitu enzymu.

Enzymem halogenalkandehalogenázou (divokou nebo modifikovanou) je sulfidický yperit hydrolyticky dehalogenován na netoxický bis(2-hydroxyethyl)sulfid. Hydrolytická dehalogenace sulfidického yperitu je katalyzována halogenalkandehalogenázou při 37 °C v 50 mM fosfátovém pufru (pH 7,5; upravené přidáním roztoku 1M NaOH). Sulfidický yperit je přidán do reakčního pufru do výsledné koncentrace 94.3 mg yperitu.l⁻¹ pufru. Reakce je spuštěna přidavkem roztoku enzymu LinB (50 mM draselnofosfátový pufr pH = 7,5, 1×10^{-5} až 1×10^{-4} mol.l⁻¹ halogenalkandehalogenázy LinB, 10 % obj. glycerolu a 1 mmol.l⁻¹ 2-merkaptioetanolu). Účinkem halogenalkandehalogenázy dojde k rychlé a úplné dekontaminaci sulfidického yperitu. Kinetika reakce je graficky znázorněna na Obr. 1. Katalytická účinnost halogenalkandehalogenázy LinB při dekontaminaci sulfidického yperitu je $k_{cat}/K_m = 6.9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$.

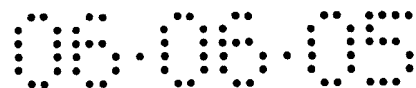


Obr. 1 - Konverze sulfidického yperitu s použitím halogenalkandehalogenázy LinB. Spontánní hydrolýza yperitu za nepřítomnosti enzymu $k_c = 0.0046 \text{ s}^{-1}$ (prázdné kroužky) a odbourávání yperitu v přítomnosti halogenalkandehalogenázy LinB $k_{cat}/K_m = 6.9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$ (černé kroužky).

Sekvence 1. Sekvence genu *linB* a halogenalkandehalogenázy LinB izolované z bakterie *Sphingomonas paucimobilis* UT26.

atg agc ctc ggc gca aag cca ttt ggc gag aag aaa ttc att gag atc aag ggc cgg cgc atg gcc tat atc
gat gaa ggg acc ggc gat ccg atc ctc ttc cag cac ggc aat ccg acg tgg tcc tat ctg tgg cgc aat atc
atg ccg cat tgc gcc ggg ctg gga cgg ctg atc gcc tgt gac ctg atc ggc atg ggc gat tgg gac aag ctc
gat ccg tgg ggg ccc gag cgt tat gcc tat gcc gag cat cgt gac tat ctc gac ggc ctg tgg gag ggc ctc
gat ctc ggg gac agg gtt gtt ctg gtc gtg cat gac tgg ggg tcc gcc ctc ggc ttc gac tgg gcc cgc cgc
cac cgc gag cgt gta cag ggg att gcc tat atg gaa ggc atc gcc atg ccg atc gaa tgg ggc gat ttt ccc
gaa cag gat cgc gat ctg ttt cag gcc ttt cgc tgg cag ggc gaa gaa ttg gtg ttg cag gac aat gtt ttt
gtc gaa caa gtt ctc ccc gga ttg atc ctg cgc ccc tta agc gaa ggc gag atg gcc gcc tat cgc gag ccc
ttc ctc gcc gcc ggc gaa gcc cgt cga ccg acc ctg tct tgg cct cgc caa atc ccg atc gca ggc acc ccg
gcc gac gtg gtc ggc atc gcc cgg gac tat gcc ggc tgg ctc agc gaa agc ccg att ccg aaa ctc ttc atc
aac gcc gag ccg gga gcc ctg acc acg ggc cga atg cgc gac ttc tgc cgc aca tgg cca aac cag acc
gaa atc acg gtc gca ggc gcc cat ttc atc cag gag gac agt ccg gac gag att ggc ggc ggc att ggc
ggc ttt gtc cgg cga ttg cgc cca gca taa

MSLGAKPFGEKKFIEIKGRRMAYIDEGTGDPILFQHGNPTSSYLWRNIMPHCAGLGRLIACDLI
GMGDSKLDPSGPERYAYAEHRDYLDALWEALDLGDRVVLVVDWGSALGFDWARRHRER



VQGIAYMEAIAMPIEWADFPEQDRDLFQAFRSQAGEELVLQDNVFVEQVLPGLILRPLSEAEM
AAYREPFLAAGEARRPTLSWPRQIPIAGTPADVVAIARDYAGWLSESPKLFINAEPGALTTG
RMRDFCRTWPNQTEITVAGAHFIQEDSPDEIGAAIAAFVRRRLRPA

Příklad 2

Pro nadprodukcí enzymu halogenalkandehalogenázy DhaA z *Rhodococcus rodochrous* NCIMB 13064 (Sekvence 2), se naklonuje odpovídající gen v pYBJA2 vektoru obsahujícím *tac* promotor (P_{tac}) za kontroly *lacI^f*. V 250 ml Luria bujónu je při teplotě 37 °C kultivována *Escherichia coli* BL21 obsahující pAQN plasmid. Indukce enzymové syntézy je iniciována přidáním isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidu až na konečnou koncentraci 0,5 mM, kdy kultura dosáhne optické hustoty 0,6 při 600 nm. Po indukci je kultura inkubována 4 h při teplotě 30°C a pak sklizena. Buňky jsou rozbity sonifikací s použitím Soniprep 150 (Sanyo, UK). Supernatant je použit po centrifugaci která probíhá 1 hodinu při 100,000 x g. Halogenalkandehalogenáza je následně čištěna na Ni-NTA Sefarózové koloně HR 16/10 (Qiagen, Německo). Halogenalkandehalogenáza s histidinovou kotvou se naváže na pryskyřici umístěnou v roztoku udržujícím rovnováhu, který obsahuje 20 mM draselnofosfátového pufru o pH 7,5; 0,5 M chloridu sodného a 10 mM imidazolu. Nevázané a slabě navázané proteiny jsou vymyty puftrem obsahujícím 60 mM imidazolu. Halogenalkandehalogenáza s histidinovou kotvou je potom vymyta puftrem obsahujícím 160 mM imidazolu. Aktivní frakce jsou dialyzovány přes noc proti 50 mM draselnofosfátového pufru, pH = 7,5. Enzym je skladován při teplotě 4 °C v 50 mM draselnofosfátovém pufru, pH = 7,5 s obsahem 10 % glycerolu a 1mM 2-merkaptoetanolu zvyšujícím dlouhodobou stabilitu enzymu.

Enzym halogenalkandehalogenáza DhaA, nebo jeho varianta, je součástí dekontaminační směsi, která obsahuje uvedený enzym v koncentraci 1×10^{-6} až 1×10^{-4} mol.l⁻¹, dále 1 až 5 obj.% alifatického uhlovodíku obecného vzorce C_nH_{2n+2} či cykloalifatického uhlovodíku obecného vzorce C_nH_{2n} , ve kterém n má hodnotu 6 až 12, dále 5 až 20 obj.% alifatického alkoholu obecného vzorce $C_nH_{2n+1}OH$, ve které n má hodnotu 2 až 4, dále 3 až 15 hm.% anionaktivního tenzidu obecného vzorce $C_nH_{2n+1}OSO_3Me$, ve kterém n má hodnotu 10 až 16 a Me značí protiion (Na^+ , K^+ či monoethanolamonium), 1 až 10 hm.% alkylbenzensulfonatu obecného vzorce $R^{(3)}-(Ar)SO_3^-.Me^+$, ve kterém $R^{(3)}$ značí alkyl o počtu uhlíkových atomů 11 až 13, a Me^+ značí sodný ion, dále složky glycinového pufru k nastavení hodnoty pH vodného roztoku v rozmezí 7 až 9, a sice glycin o celkové koncentraci 0.1 mol.l⁻¹ atd. Žádaná hodnota pH 8,2 je dosažena přidavkem 1M NaOH. Zbytek do 100% činí voda. Katalytická účinnost halogenalkandehalogenázy DhaA při dekontaminaci sulfidického yperitu je $k_{cat}/K_m = 5.7 \text{ s}^{-1}.mM^{-1}$.

Sekvence 2. Sekvence genu *dhaA* a halogenalkandehalogenázy DhaA izolované z bakterie *Rhodococcus rodochrous* NCIMB 13064.

atg tca gaa atc ggt aca ggc ttc ccc ttc gac ccc cat tat gtg gaa gtc ctg ggc gag cgt atg cac tac
gtc gat gtt gga ccg cgg gat ggc acg cct gtg ctg ttc ctg cac ggt aac ccg acc tcg tcc tac ctg tgg
cgc aac atc atc ccg cat gta gca ccg agt cat cgg tgc att gct cca gac ctg atc ggg atg gga aaa tcg
gac aaa cca gac ctc gat tat ttc ttc gac gac cac gtc cgc tac ctc gat gcc ttc atc gaa gcc ttg ggt ttg
gaa gag gtc gtc ctg gtc atc cac gac tgg ggc tca gct ctc gga ttc cac tgg gcc aag cgc aat ccg gaa
cgg gtc aaa ggt att gca tgt atg gaa ttc atc cgg cct atc ccg acg tgg gac gaa tgg ccg gaa ttc gcc
cgt gag acc ttc cag gcc ttc cgg acc gcc gac gtc ggc cga gag ttg atc atc gat cag aac gct ttc atc
gag ggt gcg ctc ccg aaa tgc gtc gtc cgt ccg ctt acg gag gtc gag atg gac cac tat cgc gag ccc ttc
ctc aag cct gtt gac cga gag cca ctg tgg cga ttc ccc aac gag ctg ccc atc gcc ggt gag ccc gcg aac
atc gtc gcg ctc gtc gag gca tac atg aac tgg ctg cac cag tca cct gtc ccg aag ttg ttg ttc tgg ggc
aca ccc ggc gta ctg atc ccc ccg gcc gaa gcc gcg aga ctt gcc gaa agc ctc ccc aac tgc aag aca
gtg gac atc ggc ccg gga ttg cac tac ctc cag gaa gac aac ccg gac ctt atc ggc agt gag atc gcg
cgc tgg ctc ccc gca ctc tag

MSEIGTGFPDPHYVEVLGERMHYVDVGPRDGPVLFLHGNPTSSYLWRNIIPHVAPSHRCIA
PDLIGMGKSDKPDLDYFFDDHVRYLDAFIEALGLEEVVLIHWDWGSALGFHWAKRNPVERVKGI
ACMEFIRPIPTWDEWPEFARETFAQARTADVGRELIIDQNAFIEGALPKCVVRPLTEVEMDHYR
EPFLKPVDPREPLWRFPNELPIAGEPANIVALVEAYMNWLHQSPVPKLLFWGTPGVLIPPAEAA
RLAESLPNCKTVDIGPGLHYLQEDNPDIGSEIARWLPAL

Příklad 3

Pro nadprodukcii enzymu halogenalkandehalogenázy DmbA z *Mycobacterium bovis* 5033/66 (Sekvence 3), se postupuje podle Příkladu 1. Enzym halogenalkandehalogenáza DmbA, nebo jeho varianta, je součástí detoxikační směsi, která obsahuje uvedený enzym v koncentraci 1×10^{-6} až 1×10^{-4} mol.l⁻¹, dále 1 až 20 obj.% alifatického alkoholu obecného vzorce $C_nH_{2n+1}OH$, ve kterém n má hodnotu 2 až 4, dále 3 až 15 hm.% anionaktivního tenzidu obecné formule $C_nH_{2n+1}OSO_3Me$, ve které n má hodnotu 10 až 16 a Me značí protiion (Na^+ , K^+ či monoetanolamonium), dále 1 až 10 hm.% ethoxylovaného nonylfenolu obecného vzorce $C_9H_{19}-Ar-O-(C_2H_4O)_nH$, kde index n je roven 9 až 10, dále složky glycinového pufru k nastavení hodnoty pH vodného roztoku v rozmezí 7 až 9, a sice glycin o celkové koncentraci 0.1 mol.l⁻¹ atd. Žádaná hodnota pH je dosažena přidavkem 1M NaOH. Zbytek do 100% činí voda. Katalytická účinnost halogenalkan-dehalogenázy DmbA při dekontaminaci sulfidického yperitu je $k_{cat}/K_m = 6.0 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$

Sekvence 3. Sekvence genu *dmbA* a halogenalkandehalogenázy DmbA izolované z bakterie *Mycobacterium bovis* 5033/66.

atg aca gca ttc ggc gtc gag ccc tac ggg cag ccg aag tac cta gaa atc gcc ggg aag cgc atg gcg
tat atc gac gaa ggc aag ggt gac gcc atc gtc ttt cag cac ggc aac ccc acg tcg tct tac ttg tgg cgc
aac atc atg ccg cac ttg gaa ggg ctg ggc cgg ctg gtg gcc tgc gat ctg atc ggg atg ggc gcg tcg gac
aag ctc agc cca tcg gga ccc gac cgc tat agc tat ggc gag caa cga gac ttt ttg ttc gcg ctc tgg gat
gcg ctc gac ctc ggc gac cac gtg gta ctg gtg ctg cac gac tgg ggc tcg gcg ctc ggc ttc gac tgg gct
aac cag cat cgc gac cga gtg cag ggg atc gcg ttc atg gaa gcg atc gtc acc ccg atg acg tgg gcg
gac tgg ccg ccg gcc gtg cgg ggt gtg ttc cag ggt ttc cga tcg cct caa ggc gag cca atg gcg ttg gag
cac aac atc ttt gtc gaa cgg gtg ctg ccc ggg gcg atc ctg cga cag ctc agc gac gag gaa atg aac
cac tat cgg cgg cca ttc gtg aac ggc ggc gag gac cgt cgc ccc acg ttg tcg tgg cca cga aac ctt cca
atc gac ggt gag ccc gcc gag gtc gtc gcg ttg gtc aac gag tac ccg agc tgg ctc gag gaa acc gac
atg ccg aaa ctg ttc atc aac gcc gag ccc ggc gcg atc atc acc ggc cgc atc cgt gac tat gtc agg agc
tgg ccc aac cag acc gaa atc aca gtg ccc ggc gtg cat ttc gtt cag gag gac agc cca gag gaa atc
ggt gcg gcc ata gca cag ttc gtc cgg cag ctc cgg tcg gcg gcc ggc gtc tga

MTAFGVEPYGQPKYLEIAGKRMAYIDEGKGDAIVFQHGNPTSSYLWRNIMPHLEGLGRLVAC
DLIGMGASDKLSPSGPDRYSYGEQRDFLFALWDALDLGDHVVLVLHDWGSALGFDWANQHR
DRVQGIAFMEAIVTPMTWADWPPAVRGVFGFRSPQGEPMALHNIFVERVLPGAILRQLSD
EEMNHYRRPFVNGGEDRRPTLSWPRNLPIDGEPAEVVALVNEYRSWLEETDMPKLFINAEPG
AIITGRIRDYVRSWPNQTEITVPGVHFVQEDSPEEIGAAIAQFVRQLRSAAGV

Příklad 4

Enzym halogenalkandehalogenáza LinB nebo jeho varianta je součástí detoxikační směsi, která obsahuje uvedený enzym v koncentraci 1×10^{-6} až 1×10^{-4} mol.l⁻¹, dále 1 až 15 hm.% anionaktivního tenzidu obecného vzorce $C_nH_{2n+1}OSO_3Me$, ve které n má hodnotu 10 až 16 a Me značí protiion (Na^+ , K^+ či monoethanolamonium), dále 1 až 10 % hmot. ethoxylovaného nonylfenolu obecného vzorce $C_9H_{19}-Ar-O-(C_2H_4O)_nH$, kde index n je roven 9 až 10, dále složky fosfátového pufru k nastavení hodnoty pH vodného roztoku v rozmezí 7,0 až 8,5, a sice KH_2PO_4 a K_2HPO_4 v potřebném poměru a o celkové koncentraci 50 mmol.l⁻¹ atd. Zbytek do 100 hmot. % činí voda.

Průmyslová využitelnost

Vynález je průmyslově využitelný k odstraňování sulfidického yperitu z povrchů vojenské techniky, přepravní, průmyslové a zemědělské techniky, technických zařízení a stavebních objektů, kůže osob či zvířat a složek životního prostředí, které jsou kontaminovány touto vysoce toxickou zpuchýřující látkou. Technologie je využitelná ve vojenství i civilní správě, obecně všude tam, kde je nutno používat detoxikační směsi k dekontaminaci zpuchýřujících látek.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob detoxikace sulfidického yperitu působením halogenalkandehalogenáz **vyznačený tím**, že se na sulfidický yperit působí alespoň jednou halogenalkandehalogenázou vybranou ze skupiny enzymů s kódovým číslem EC 3.8.1.5 při koncentrací enzymu v rozmezí 1×10^{-6} až 1×10^0 mol.l⁻¹, teplotě +10 °C až +70 °C a pH = 4 až 12 v kapalném prostředí.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačený tím**, že halogenalkandehalogenázou je enzym vybraný ze skupiny zahrnující dehalogenázu DhaA z *Rhodococcus rodochrous* NCIMB 13064, DmbA z *Mycobacterium bovis* 5033/66, LinB ze *Sphingomonas paucimobilis* UT26.
3. Způsob podle nároku 1 a 2, **vyznačený tím**, že jako halogenalkandehalogenáza se použije divoká nebo modifikovaná halogenalkandehalogenáza nebo směs obou.
4. Způsob podle nároku 1 až 3, **vyznačený tím**, že se příprava halogenalkandehalogenáz provádí v přítomnosti nejméně jednoho stabilizátoru proteinů, vybraného ze skupiny zahrnující polyalkoholy, inaktivní proteiny, nebo polymery.
5. Způsob podle nároku 1 až 4, **vyznačený tím**, že kapalným prostředím je organické rozpouštědlo, jednofázový vodný roztok organického rozpouštědla, dvojfázový systém tvořený organickou a vodnou fází.
6. Způsob podle nároku 1 až 5, **vyznačený tím**, že se použije enzym halogenalkandehalogenáza v rozpustné formě nebo ve formě krystalické nebo ve formě lyofilizované nebo ve vysrážené formě.
7. Způsob detoxikace sulfidického yperitu podle nároku 1 až 6, **vyznačený tím**, že enzym halogenalkandehalogenáza je imobilizován adsorbci nebo iontovou vazbou nebo kovalentní vazbou na povrchu nosiče.
8. Způsob detoxikace sulfidického yperitu podle nároku 1 až 6, **vyznačený tím**, že enzym halogenalkandehalogenáza je imobilizován vytvořením vzájemných příčných vazeb nebo uzavřením enzymu do pevné matrice nebo do prostoru odděleného membránou.

06.06.05

- 13 -

9. Způsob podle nároků 1 až 8, **vyznačený tím**, že se detoxikace provádí v přítomnosti povrchově aktivních látek.