



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

262238

(11) (B3)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 11/18

(61) Autorské osvědčení je závislé
na autorském osvědčení č. 231 656

(22) Přihlášeno 30 06 87

(21) (PV 4911-87.S)

(40) Zveřejněno 15 07 88

(45) Vydáno 15 05 89

112 posledek stanov (předání vynálezu)

(75)

Autor vynálezu

VOJTÍŠEK VLADIMÍR RNDr. CSc., NOVÁK MIROSLAV ing. CSc.,
HOLLEROVÁ IDA ing., HASAL PAVEL ing. CSc., VANČURA ALEŠ ing.,
KRUMPHANZL VLADIMÍR člen korespondent ČSAV,
SLAVÍČEK FRANTIŠEK ing., JARÝ JIŘÍ prof. ing. DrSc., PRAHA

(54) Směsný imobilizovaný buněčný a enzymový biokatalyzátor k přeměně
D-glukózy na D-glukonát a k přeměně sacharózy na D-glukonát
a D-fruktózu a způsob jeho výroby

1

Vynález se týká směsného imobilizovaného buněčného a enzymového biokatalyzátoru k přeměně D-glukózy na D-glukonát a k přeměně sacharózy na D-glukonát a D-fruktózu, který je připravitelný podle čs. autorského osvědčení č. 231 656 a způsobu jeho výroby.

Podle toho jaké je kvalitativní zastoupení jednotlivých enzymů ve směsném biokatalyzátoru a podle použitého substrátu k enzymové přeměně, lze získat buď čistý D-glukonát, nebo D-glukonát a D-fruktózu.

Oba produkty enzymové biotransformace, D-glukonát a D-fruktóza, které lze získat využitím předmětného biokatalyzátoru v jednom technologickém stupni v poměrně vysokém výtěžku, mají značný praktický význam v řadě průmyslových odvětví.

D-glukonát a jeho soli především ve strojírenství a vůbec v kovoprůmyslu, k čištění a rozpouštění okují po svařování, zejména k rozpouštění okují v reaktorech pro atomové elektrárny, při povrchové úpravě kovů v čistících, leštících a galvanizačních lázních a k leštění trubek a odstraňování usazenin v potrubích. V průmyslu výroby barev se D-glukonát používá jako aditiva do barev a laků, ve stavebnictví jako přísada do speciálních přepjatých betonů, která vede ke zpomalení tuhnutí betonu a zvýšení

2

jeho kvalitativních vlastností. Ve farmaceutickém průmyslu slouží D-glukonát a jeho soli jako surovina pro výrobu některých vitamínů řady B. Druhý produkt enzymové biotransformace, D-fruktóza, má 1,7× vyšší sladivost než sacharóza a odtud plyne jeho průmyslový význam především v potravinářském průmyslu, kde jej lze využít buď samotného, nebo ve směsi s glukózou (ke zlepšení organoleptických vlastností) ve výrobě různých nápojů, zejména limonád a ve výrobě cukrovinek. D-fruktózu lze rovněž využít, a v některých případech velmi výhodně, jako zdroj uhlíku a energie pro fermentaci, zejména pro kvasný a farmaceutický průmysl (výroba antibiotik, aminokyselin, organických kyselin, fenylacetylkarbinolu apod.).

Je známo, že enzym glukózaoxidáza (EC 1.1.3.4) katalyzuje oxidaci D-glukózy na D-glukonolakton v přítomnosti flavinových koenzymů FAD/FADH₂ při vstupu kyslíku do reakce. Vznikající peroxid vodíku je enzymem katalázou (EC 1.11.1.6) štěpen na molekulární kyslík a vodu, přičemž z přechodného meziprojektu, D-glukonolaktonu, vzniká adicí vody D-glukonát. Zdrojem obou enzymů jsou různé biologické materiály, zejména rostlinné a především mikrobiální buňky, zvláště některé druhy imperfektních

hub z rodu *Aspergillus*. Enzymy glukóza-oxidáza a kataláza jsou v mikrobiálních buňkách lokalizovány společně v tzv. elektrokondenzačních mikrozómech — peroxizómech. Tato lokalizace obou enzymů v podbuněčné struktuře buňky má velký význam, neboť glukózaoxidázou generovaný peroxid vodíku je ihned „in situ“ katalázou štěpen na kyslík a vodu. Kdyby toto spřažení obou enzymově katalyzovaných biochemických reakcí neexistovalo, pak by vznikající a hromadící se peroxid vodíku za velmi krátkou dobu nevratně denaturoval vlastní enzym, který jej generuje, což by ve svých důsledcích vedlo k smrti buňky.

Prostřednictvím intaktních, zejména mikrobiálních buněk, obsahujících oba tyto enzymy, lze tedy připravit jednorázovou enzymovou biotransformací vodného roztoku D-glukózy D-glukonát, resp. jeho soli, neboť vznikající D-glukonová kyselina musí být během reakce kontinuálně neutralizována roztokem alkálie, aby nedošlo k silnému snížení hodnot pH prostředí, které by vedlo ke snížení, resp. zastavení enzymové reakce. Druhou možností je příprava D-glukonátu z D-glukózy submersní jednorázovou kultivací produkčních mikroorganismů ve fermentačním tanku. Je pochopitelné, že tuto enzymovou přeměnu D-glukózy je možné jednorázově provádět i různě čistými preparáty obou rozpustných izolovaných enzymů.

Tyto postupy však nejsou příliš ekonomické, neboť pro výrobu D-glukonátu z D-glukózy je třeba fermentačním způsobem připravit vždy novou šarži buněk. V ojedinělých případech lze intaktní mycelium mikrobiálních buněk použít opakovaně, přičemž je pochopitelné, že stupeň teoretické konverze substrátu na požadovaný produkt klesá v závislosti na počtu opakovaných cyklů použití, neboť intaktní mycelium je smykovým namáháním v míchaném reaktoru mechanicky destručováno a enzymy se ze subtilních struktur buňky uvolňují do vodné fáze, solubilizují a specifická enzymová aktivita klesá. Dalším komplikujícím faktorem, z hlediska enzymové přípravy D-glukonátu z D-glukózy je kvantitativní poměr glukózaoxidázy a katalázy v produkčních mikrobiálních buňkách.

V čs. autorském osvědčení č. 247 531 je popsána vysokoprodukční mutanta kmene *Aspergillus foetidus* var. *pallidus* AN 166, syntetizující vysoké množství glukózaoxidázy. Specifická aktivita glukózaoxidázy u tohoto kmene je ve srovnání s jinými průmyslově významnými mikrobiálními kmeny — producenty tohoto enzymu, 7 až 10krát vyšší.

Produkce enzymu katalázy je však s ostatními kmeny kvantitativně srovnatelná. Tento kmen syntetizuje i enzym β -D-fruktofuranozidázu-invertázu (EC 3.2.1.26), což umožnilo vypracovat fermentační způsob

výroby buď D-glukonátu z D-glukózy podle čs. autorského osvědčení č. 250 277 nebo, a to zejména, fermentační způsob výroby D-glukonátu vedle D-fruktózy ze sacharózy a meziproductů její výroby podle čs. autorského osvědčení č. 259 439.

Obsah invertázy v buňkách tohoto produkčního kmene však rovněž nepřesahuje běžně dosahovaných množství, je však dostačující k jednorázové fermentační výrobě D-glukonátu vedle D-fruktózy ze sacharózy.

Ve světové odborné a patentové literatuře, zahrnující v to i Československo, jsou již více jak 15 let patrné snahy o ekonomizaci výroby D-glukonátu na bázi její výroby z D-glukózy pomocí různým způsobem imobilizovaných buněk s glukózaoxidázou a katalázovou aktivitou, nebo těchto enzymů předem izolovaných a následně imobilizovaných nejrozličnějšími způsoby imobilizace. Tyto imobilizované biokatalyzátory, ať již na bázi imobilizovaného enzymu nebo buněk, mají oproti výše uvedeným fermentačním způsobům výroby tu výhodu, že imobilizované biokatalyzátory lze využívat mnohonásobně opakovaně nebo kontinuálně pro výrobu D-glukonátu z D-glukózy.

Enzym glukózaoxidáza je značně nestabilní při pH nad hodnoty 7.0. Stabilitu tohoto enzymu v závislosti na pH prostředí lze významně zvýšit prokřížením bílkovinných molekul glutaraldehydem (Solomon a sp., *Biopolymers*, 16, 1837, 1977). Glukózaoxidáza je též inhibována a inaktivována peroxidem vodíku, přičemž redukováná forma tohoto enzymu je inaktivována 100× rychleji než forma oxidovaná (Kleppe, *Biochemistry*, 5, 139, 1966). Greenfield a sp. (*Anal. Biochem.* 65, 109, 1975) proto koimobilizoval katalázu spolu s glukózaoxidázou na částice ve vodě nerozpustného nosiče. Karube a sp. (*Biotechnol. Bioeng.* 19, 1233, 1977) imobilizovali glukózaoxidázu na povrchu vlastního mikrobiálního producenta — mycelium *Aspergillus niger* glutaraldehydem v přítomnosti albuminu a konečně Hertmeier a Döppner (*Biotechnol. Lett.* 5, 743, 1983) koimobilizovali nadbytek katalázy na povrchu produkčního mycelia *Aspergillus niger* (obsahující v buňkách glukózaoxidázu) prokřížením molekul katalázy glutaraldehydem v přítomnosti albuminu.

Z patentové literatury lze uvést například různé způsoby imobilizace enzymů glukózaoxidázy a katalázy na částice ve vodě nerozpustných nosičů syntetického nebo přírodního původu organické nebo anorganické povahy, které jsou uvedeny v NSR DOS 2 021 149 a DOS 2 214 442, v čs. autorských osvědčeních č. 214 096, č. 209 743 a č. 234 059. V těchto případech se jedná o kombinaci sorpce těchto enzymů na ve vodě nerozpustné částice a jejich následné kovalentní zesíťování glutaraldehydem, nebo

kovalentní vazbu směsí těchto enzymů na různým způsobem chemicky aktivované částice různých nosičů. V čs. autorském osvědčení č. 231 656 je popsáno kovalentní zesíťení směsi obou těchto enzymů reaktivními ve vodě rozpustnými polymery. Pokud jde o imobilizaci mikrobiálních buněk, zvláště pak imperfektních hub s glukózo-oxidázovou aktivitou, pak způsob imobilizace a biokatalyzátory na bázi celých zesíťených a permeabilizovaných buněk, resp. počet je popsán v čs. autorském osvědčení č. 209 265 a způsob imobilizace a biokatalyzátory s těmito aktivitami na bázi buněčných agregátů vzniklých pomocí reaktivních ve vodě rozpustných polymerů v čs. autorském osvědčení č. 231 453.

Zmíněné literární a patentové údaje vedly k vypracování různých imobilizovaných biokatalyzátorů buď na bázi imobilizovaných enzymů glukózooxidázy a katalázy, nebo na bázi imobilizovaných buněk s těmito enzymovými aktivitami, s cílem enzymové přeměny D-glukózy na D-glukonát. Nicméně tyto biokatalyzátory buď vykazovaly nízkou specifickou aktivitu, nebo vykazovaly vysokou specifickou aktivitu s vysokým stupněm stabilizace těchto enzymových aktivit, avšak z hlediska průmyslového využití dosahované operační poločasy nedovolují reálný předpoklad výroby D-glukonátu z D-glukózy.

Operační poločasy těchto biokatalyzátorů se pohybují mezi 10 až 20 cykly opakovaného použití teže násady biokatalyzátoru, přičemž se vzrůstající počáteční koncentrací substrátu (D-glukózy), klesá operační poločas, neboť se generuje vyšší množství peroxidu vodíku, který glukózo-oxidázu nevratně inaktivuje, není-li koimobilizován obrovský přebytek katalázy.

Předmětné řešení s cílem překonání uvedených komplikací spočívá v tom, že oba klíčové enzymy, glukózooxidáza a kataláza, se vzájemně koimobilizují do vzájemně kovalentně prokřížené sítě bez použití ve vodě nerozpustných nosičů spolu s buněčnými fragmenty a peroxizómy produkčních mikroorganismů v takovém poměru a v takové formě, aby vznikající peroxid vodíku byl in situ, bez difúzní bariéry a na kterémkoliv místě částice biokatalyzátoru (na povrchu i blíže ke středu částice) ihned přeměňován na vodu a molekulární kyslík, při případné a současně koimobilizaci dalších enzymů, zejména invertázy a glukózaizomerázy, v takovém poměru a tak, aby vzniklý směsný biokatalyzátor mohl být využit nejen pro přípravu D-glukonátu z D-glukózy, ale i D-glukonátu vedle D-fruktózy ze sacharózy, resp. D-glukózy.

Předmětný vynález se týká směsného imobilizovaného buněčného a enzymového biokatalyzátoru k přeměně D-glukózy na D-glukonát a k přeměně sacharózy na D-glukonát a D-fruktózu podle čs. autorského o-

svědčení č. 231 656 který je připravitelný z desítek prvaných nebo autolyzovaných směsí buněk produkčních mikroorganismů nebo desítek prvaných nebo autolyzovaných rostlinných nebo živočišných tkání, obsahujících enzymy glukózooxidázu, katalázu a popř. invertázu a/nebo glukózaizomerázu, nebo celé buňky a/nebo podbuněčné částice, zejména peroxizómy a buněčné stěny nesoucí některé z těchto enzymových aktivit, nebo tyto enzymy rozpustné, technické, nebo do různého stupně čistoty izolované z různých biologických zdrojů, zejména z produkčních buněk mikroorganismů, jejich zpracováním s vodným roztokem glutaraldehydu a/nebo polyethyleniminu nebo bílkovina mikrobiálního, rostlinného nebo živočišného původu a vodným roztokem glutaraldehydu, separací a mechanickou homogenizací vzniklého produktu a jeho následným suspendováním v ochlazených organických rozpouštědlech neomezeně mísitelných s vodou, opětovnou separací a sušením a konečně jeho promytím vodou nebo pufrům.

Předmětný vynález se rovněž týká způsobu výroby směsného buněčného a enzymového biokatalyzátoru, který spočívá v tom, že do nepřetržitě míchané reakční směsi částic se po úpravě pH v rozmezí hodnot 6,0 až 8,0, s výhodou 6,5 až 7,5, přidá vodný roztok glutaraldehydu v rozmezí jeho koncentrací 0,1 až 10 % objem/objem, nebo vodný roztok polyethyleniminu nebo vodný roztok bílkovin a následně vodný roztok glutaraldehydu, znovu se upraví pH reakční směsi v rozmezí uvedených hodnot a reakční směs se nepřetržitě míchá po dobu 1 až 5 hodin nebo ponechá v klidu, načež se částice separují, mechanicky homogenizují a za míchání ošetří ochlazeným acetonem nebo ethanolem a/nebo jejich směsí s vodou, znovu separují a suší po dobu 1 až 24 hodin při teplotě 10 až 40 °C, poté se biokatalyzátor suspenduje ve vodě nebo v pufru, několikrát dekantuje a promyje, ponechá nabobtnat a separuje.

Měření aktivity glukózooxidázy (dále jen GOD) bylo prováděno sledováním úbytku kyslíku z reakční směsi kyslíkovým článkem na počátku oxidace roztoku D-glukózy v průběhu nepřetržitého míchání. Jedna jednotka GOD aktivity (U) je takové množství enzymu, které odpovídá spotřebě jednoho μmolu kyslíku za minutu v prostředí 0,05 M citrátového pufru o pH 5,8 při teplotě 30 °C v podmínkách reakční kinetiky nultého řádu.

Měření aktivity katalázy (dále jen KAT) bylo prováděno manometrickou titrací úbytku peroxidu vodíku v průběhu nepřetržitého míchání reakční směsi. Jedna jednotka KAT aktivity (U) je takové množství enzymu, které odpovídá hydrolýze jednoho μmolu H₂O₂ za minutu v prostředí 0,1 M fosfátového pufru pH 7,1 při teplotě 20 °C

v podmínkách reakční kinetiky nultého řádu.

Měření aktivity invertázy (dále jen INV) bylo prováděno kolorimetricky měřením úbytku absorbance Fehlingova činidla po vyloučení kyslíčnicku měďného při 680 nm za použití roztoku sacharózy jako substrátu (neredukující cukr). Během enzymové reakce byla reakční směs nepřetržitě míchána. Jedna jednotka INV aktivity (U) je takové množství enzymu, které odpovídá vytvoření jednoho μ molu D-glukózy za minutu v prostředí 0,05 M acetátového pufru o pH 4,6 při teplotě 30 °C v podmínkách reakční kinetiky nultého řádu.

Měření aktivity glukózaizomerázy (dále jen GI) bylo prováděno kolorimetricky použitím resorcinového činidla s HCL, které po zahřátí s roztokem D-fruktózy vytváří barevný komplex, jehož absorbance se měří při 410 nm za použití D-glukózy jako substrátu. Jedna jednotka GI aktivity (U) je takové množství enzymu, které odpovídá vytvoření jednoho μ molu D-fruktózy za minutu v prostředí 0,2 M maleátového pufru obsahujícím 0,02 M $MgSO_4$ a 0,001 M $CoCl_2$ o pH 8,0 při teplotě 70 °C v podmínkách reakční kinetiky nultého řádu.

Specifická aktivita výchozích enzymově aktivních materiálů a imobilizovaných částic směsného biokatalyzátoru pak je vyjadřována v uvedených jednotkách GOD, KAT, INV a GI, jejichž počet je vztažen na 1 gram suché hmoty materiálu ($U \cdot g^{-1}$ suché hmoty).

Koncentrace D-glukonátu byly stanoveny izotachoforeticky. Jako vodícího elektrolytu bylo použito 0,1 M roztoku kakodylátu sodného, terminálním elektrolytem byla směs 0,1 M roztoku L-histidinu a 0,1 M L-histidinhydrochloridu. Dělení probíhalo při 20 kV a 25 μ A při teplotě 18 °C, doba dělení 20 minut.

V dalším je vynález doložen v příkladech provedení, aniž by se jimi omezoval.

Příklady provedení

Příklad 1

Produkční mikroorganismus *Aspergillus foetidus* var. *pallidus* AN 166, který byl získán podle čs. autorského osvědčení č. 247 531, a který byl submersně kultivován ve fermentačním tanku v živné půdě a způsobem podle čs. autorského osvědčení č. 259 439, byl po 45 hodinách kultivace separován na vakuové filtrační bubnové odstředivce.

5 kg vlhké hmoty odstředěných pelet *A. foetidus* (1 kg suché hmoty) obsahující 184,2 $U \cdot g^{-1}$ GOD a 2,88 $U \cdot g^{-1}$ KAT bylo suspendováno v 5 litrech destilované vody a suspenze pelet byla desintegrována jednorázovým průchodem šterbinovým desintegrátorem Manton-Gaulin při tlaku 40 MPa.

Byla získána voluminězní desintegrovaná suspenze produkčního mikroorganismu obsahující 660 $U \cdot g^{-1}$ GOD a 8,7 $U \cdot g^{-1}$ KAT.

Produkční mikroorganismus *Candida tropicalis*, který byl submersně kultivován ve fermentačním tanku v živné půdě obsahující minerální soli, kukuřičný extrakt a jako zdroj uhlíku 1 % objem/objem směsi n-alkanů o složení: 23,9 % n-dekanu, 46,8 % n-undekanu, 26,3 % n-dodekanu a 3 % n-tridekanu, byl po 16 hodinách kultivace separován odstředěním.

5 kg vlhké hmoty odstředěných kvasinek *C. tropicalis* (1,25 kg suché hmoty) obsahující 350 $U \cdot g^{-1}$ KAT bylo suspendováno v 5 litrech destilované vody a vychlazená buněčná suspenze byla desintegrována balotinou na zařízení Dyno Mill po částech vždy po dobu 20 minut. Byla získána desintegrovaná suspenze produkčního mikroorganismu, obsahující 700 $U \cdot g^{-1}$ KAT.

Obě desintegrované suspenze byly smíchány v objemovém poměru 1 : 1 a převedeny do nerezového míchaného kotle, v kterém bylo předem předloženo 20 litrů reaktivního ve vodě rozpustného polymeru RRP, vzniklého reakcí kationaktivních flokulantů obsahujících frakci polyethyleniminu a glutaraldehydu podle čs. autorského osvědčení č. 231 656. Vzniklo 40 litrů reakční směsi, v které bylo v průběhu nepřetržitého míchání upraveno pH 20 % hmota/objem roztokem NaOH na hodnotu 7,0, reakční směs byla jednu hodinu nepřetržitě míchána a poté bylo přidáno pomalu a postupně 3,2 litru 25% vodného roztoku glutaraldehydu. Po přidání roztoku sířovadla bylo opět za míchání upraveno pH uvedeným roztokem NaOH opět na hodnotu 7,0, reakční směs 2 hodiny pomalu míchána a poté ponechána 1 hodinu v klidu.

Po uvedené době reakce byla suspenze voluminězních částic vedena na vakuovou bubnovou filtrační odstředivku (buben překryt kalolisovou plachtou) a částice odstředěny. Vlhký koláč byl mechanicky homogenizován na kuchyňském robotu na strouhanou housku, přičemž zařízení bylo opatřeno strouhacím kovovým bubnem o velikosti řezných otvorů 0,5 až 1,0 mm. Vzniklé vlhké nastrouhané granule byly zváženy a bylo získáno 12 kg vlhké hmoty materiálu.

V rozmíchacím nerezovém kotlíku opatřeném duplikátorem chlazeným solankou a rychloběžným vrtulovým míchadlem, bylo předloženo 70 litrů acetonu, který byl podchlazen na -5 °C a dále podchlazen vnášením suchého ledu na teplotu -20 °C. Do vychlazeného acetonu bylo za míchání (700 otáček $\min^{-1}$) vsypáno 12 kg vlhké hmoty granulovaného materiálu a suspenze intenzivně míchána po dobu maximálně 5 minut. Poté byla suspenze částic rychle a ostře odsáta na nuči, z částic přebytečný aceton na nuči vymačkán a částice uloženy