



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY

A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

233 868

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 04 05 83
(21) (PV 3165-83)

(51) Int. Cl.³ C 12 N 11/16

(40) Zveřejněno 13 08 84
(45) Vydáno 01 04 87

(75)

Autor vynálezu MAREK MIROSLAV ing. CSc.,
VALENTOVÁ OLGA RNDr. CSc.,
KÁŠ JAN ing. CSc., PRAHA

(54) Způsob vazby enzymů na buňky vykazující enzymovou aktivitu

Vynález se týká způsobu vazby enzymů na buňky, resp. buněčné fragmenty. Způsob vazby spočívá v tom, že se polysacharidy obsažené ve stěnách buňky aktivují jodistanovým oxidačním štěpením a prostřednictvím vzniklých aldehydových skupin se naváže enzym buď přímou vazbou nebo pomocí Ugiho čtyřkomponentní reakce. Použité buňky zde přitom neslouží pouze jako nosiče pro imobilisaci enzymu, nýbrž jako aktivní složka vytvářeného biokatalyzátoru. Vazbou enzymu na buňky je možno výrazně zvýšit specifickou aktivitu klíčového enzymu buňky nebo v případě enzymu, který buňky neobsahují, je možno připravit biokatalyzátor s různými (s výhodou na sebe navazujícími) enzymovými aktivitami.

Pro přípravu heterogenních biokatalyzátorů imobilizací buněk se zvýšenou aktivitou klíčového enzymu či kombinací několika enzymových aktivit je způsob podle vynálezu zvláště výhodný v kombinaci s imobilizací buněk dle A0 223 474, při níž jsou sacharidové složky buněčných stěn potřebným způsobem již před imobilizací aktivovány.

233 888

Vynález se týká způsobu vazby enzymů na buňky, resp. buněčné fragmenty.

Při přípravě biokatalysátorů je možno enzymové aktivity imobilisovat v různé formě. Lze imobilisovat rozpustné enzymy, modifikované rozp. enzymy, celé či modifikované buňky a také různé kombinovat naznačené možnosti.

Podle AO 223 474 lze imobilisovat na nosiče celé buňky, případně subcelulární částice, přičemž jsou katalyticky využívány v nich obsažené enzymy. Podle AO 223 475 lze chemickou modifikací buněčných stěn zvýšit aktivitu enzymu přirozeně vázaného na buňku.

Vazbou enzymu na buňky, resp. buněčné fragmenty je možno výrazně zvýšit specifickou aktivitu klíčového enzymu buňky nebo subcelulární částice. V případě enzymu, který buňky neobsahují, je možno připravit biokatalysátor s různými enzymovými aktivitami. K vazbě mezi enzymem a povrchem buňky se dosud používalo především polyfunkčních činidel /toluendiisokyanátu, polyfunkčních aldehydů ap./ nebo vzácněji komplexních hydroxidů transitních kovů, především titanu.

Způsob vazby enzymu na buňky, resp. buněčné fragmenty, podle vynálezu spočívá v tom, že se polysacharidy obsažené ve stěnách buňky aktivují oxidačním štěpením jodistanovými ionty v množství 0,001 až 0,05 molů na 1 g vlhkých buněk při pH 4 až 8 a teplotě 0 až 30 °C a prostřednictvím vzniklých aldehydových skupin se na ně naváže enzym buď přímou vazbou nebo pomocí Ugiho čtyřkomponentní reakce. V případě glykoproteinových enzymů je alternativně

možná imobilisace těchto glykoproteinů po analogické aktivaci jejich cukerné složky spojením s oxidovanými buňkami či buněčnými fragmenty pomocí bi- a vícefunkčních aminů, pomocných bílkovin ap. Použité buňky zde přitom neslouží pouze jako nosiče pro imobilisaci enzymu, nýbrž jako aktivní složka vytvářeného biokatalysátoru.

Pro přípravu imobilisovaných biokatalysátorů se zvýšenou aktivitou klíčového enzymu či kombinací několika enzymových aktivit je způsob podle vynálezu zvláště výhodný v kombinaci s imobilisací buněk, resp. subcelulárních částic, při níž jsou cukerné složky buněčných stěn před imobilisací na nosiče aktivovány jodistanovým oxidačním štěpením.

Výhodou způsobu vazby enzymu na buňky podle vynálezu je vedle experimentální jednoduchosti vysoký stupeň zachování enzymové aktivity, kdy při aktivaci cukerných složek buněčných stěn jodistanovým oxidačním štěpením dochází k zvýšení aktivity enzymů buněk, resp. subcelulárních částic.

Vynález je dokumentován příklady použití.

Příklad 1

K 10 g odstředěných a promytých buněk *Saccharomyces uvarum* bylo přidáno 125 ml 0,05 M fosfátového pufru pH 6 a 30 ml 0,05 M jodistanu sodného. Po 6 h třepání při 4 °C za nepřístupu světla byly oxidované buňky odstředěny a promyty 0,05 M fosfátovým pufrům pH 7,3. K 10 g oxidovaných buněk byl přidán roztok glukso-oxidasy obsahující 300 mg bílkoviny ve 125 ml 0,05 M fosfátovém pufru pH 7,5. Po 16 h třepání při 4 °C byly buňky s navázaným enzymem odstředěny a promyty 0,05 M fosfátovým pufrům pH 6. U získaného preparátu byla zjištěna invertasová aktivita 1 750 nkat/g sušiny a gluksooxidasaová aktivita 650 nkat/g sušiny.

Příklad 2

K 5 g oxidovaných buněčných stěn /připravených z buněčných stěn kvasinek *Saccharomyces uvarum* shodným postupem jako v příkla-

du 1/ bylo přidáno 80 ml roztoku glukosaoxidasu o obsahu 190 mg bílkoviny v 0,05 M fosfátovém pufru pH 7,5. Po 16 h třepání při 4 °C byly buněčné stěny s navázanou glukosaoxidase odštěpeny a promyty 0,05 M fosfátovým pufrům pH 6. Získaný preparát o invertasové aktivitě 4 120 nkat/g sušiny a glukosaoxidase aktivitě 1 150 nkat/g sušiny byl zabudován do matrice polyakrylamidového gelu. K 5 g preparátu ve 22 ml fyziologického roztoku bylo za míchání přidáno 0,4 g akrylamidu, 0,022 g N,N'-methylenbisakrylamidu, 0,23 ml 5% roztoku 3-dimethylaminopropionitrilu a 0,23 ml 2,5% roztoku persíranu draselného. Po ztuhnutí byl vzniklý gel temperován 0,5 h při 37 °C ve vodní lázni a poté byl rozmixován. Získaný imobilizovaný preparát měl invertasovou aktivitu 1 100 nkat/g sušiny a glukosaoxidase aktivitu 260 nkat/g sušiny.

Příklad 3

K 10 g oxidovaných buněčných stěn /připravených podle příkladu 1/ ve 125 ml 0,05 M fosfátovém pufru pH 7,3 bylo přidáno 25 g glycidylmethakrylátového gelu modifikovaného 1,6-diaminohexanem /G-70-HMDA/. Po 16 h mírného třepání při 4 °C byl preparát promyt 0,05 M fosfátovým pufrům pH 7,3 a po přidání 1 g albuminu ve 100 ml téhož pufru byla směs opět třepána 6 h. Poté bylo k získanému konjugátu přidáno 125 ml oxidované glukosaoxidasu o obsahu 300 mg bílkoviny. Po 16 h třepání při 4 °C a následujícím promytím získaného preparátu 0,05 M fosfátovým pufrům pH 6 byla zjištěna glukosaoxidase aktivita 770 nkat/g sušiny a invertasová aktivita 810 nkat/g sušiny.

Příprava oxidované glukosaoxidasu

Roztok glukosaoxidasu obsahující 65 mg bílkoviny ve 130 ml 0,1 M acetátového pufru pH 5 byl oxidován 5,2 ml 0,05 M jodistanu sodného po dobu 4 h za nepřístupu světla při 4 °C. Přebytek jodistanu sodného byl odstraněn přidávkou 0,14 ml ethylenglykolu. Po dalším 0,5 h míchání byla reakční směs dialysována 16 h proti 3 l 0,05 fosfátového pufru pH 6.

Příklad 4

K 20 ml oxidované glukosaoxidasu o obsahu 160 mg bílkovin/ml bylo přidáno 20 ml katalasy o shodné koncentraci bílkovin. Po

12 h míchání při 4 °C bylo k této směsi přidáno 5 g vlhkých oxidovaných buněk *Saccharomyces uvarum* připravených podle příkladu 1. Po 16 h mírném třepání a následujícím odstředění a promytí 0,05 M fosfátovým pufrům pH 6 byla u získaného buněčného preparátu s navázanými enzymy zjištěna invertasová aktivita 2 300 nkat/g sušiny, glukosaoxidasaová aktivita 900 nkat/g sušiny a katalasaová aktivita 4 375 nkat/g sušiny. Získaný buněčný preparát byl imobilisován zapolymerováním do matrice polyakrylamidového gelu postupem uvedeným v příkladu 2. U získaného biokatalysátoru byla zjištěna invertasová aktivita 580 nkat/g sušiny, glukosaoxidasaová aktivita 230 nkat/g sušiny a katalasaová aktivita 1 090 nkat/g sušiny.

Příklad 5

10 g buněk *Saccharomyces uvarum* bylo oxidováno postupem podle příkladu 1. K oxidovaným a 0,05 M fosfátovým pufrům pH 7,3 promytým buňkám bylo přidáno 10 g epichlorhydrinem a 1,6-diaminohexanem aktivované perlové celulosy. Po 12 h mírného třepání při 4 °C byla směs dekantována 0,05 M fosfátovým pufrům pH 7,3. K získanému preparátu s imobilisovanými buňkami o invertasové aktivitě 1 860 nkat/g sušiny byl přidán roztok konjugátu glukosaoxidasy a katalasy připravený podle příkladu 4. Po 12 h mírného třepání a následující dekantaci 0,05 M fosfátovým pufrům pH 6 byla zjištěna u získaného preparátu invertasová aktivita 1 100 nkat/g sušiny, glukosaoxidasaová aktivita 510 nkat/g sušiny a katalasaová aktivita 2 200 nkat/g sušiny.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

233 868

1. Způsob vazby enzymu na buňky, resp. buněčné fragmenty, vykazující enzymovou aktivitu, vyznačující se tím, že se polysacharidy obsažené ve stěnách buňky aktivují oxidačním štěpením jodistanovými ionty v množství 0,001 až 0,5 molu na 1 g vlhkých buněk při pH 4 až 8 a teplotě 0 až 30 °C a prostřednictvím vzniklých aldehydových skupin se na ně naváže enzym, vytvořený konjugát s navázaným enzymem se popřípadě imobilisuje vazbou na nosič nebo se zabuduje do matrice gelu.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vazba enzymu provede přímou reakcí vytvořených aldehydových skupin s aminoskupinami enzymu, případně pomocí Ugiho čtyřkomponentní reakce.
3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se v případě glykoproteinových enzymů či uměle vytvořených glykoproteinů po analogické aktivaci jejich cukerné složky provede imobilisace na oxidovanou buňku či buněčný fragment pomocí bi- a více-funkčních aminů nebo pomocných bílkovin.
4. Způsob podle bodu 1 až 3, vyznačující se tím, že se enzym na buňky váže ve formě imobilisovaných buněk s buněčnou stěnou aktivovanou jodistanovým oxidačním štěpením.