

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

265 006

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 11/08

(21) PV 6466-86.A

(22) Přihlášeno 08 09 86

(40) Zveřejněno 15 12 88

(45) Vydáno 15 01 90

(75)
Autor vynálezu

VERUOVIC BUDIMÍR doc. ing. CSc.,
JIRKA VLADIMÍR RNDr. CSc.,
KUBÁNEK VLADIMÍR prof. ing. CSc.,
KRÁLÍČEK JAROSLAV prof. ing. DrSc., PRAHA

(54)

Způsob přípravy imobilizovaných mikrobiálních
a rostlinných buněk a enzymů

(57) Způsob imobilizace mikrobiálních
a rostlinných buněk a enzymů do polymer-
ní matrice spočívá v tom, že se mikro-
biální, popřípadě rostlinné bunky nebo
enzymy zhomogenizují při teplotě 25 až
35 °C s polymerní matricí, připravenou
reakcí epoxydové pryskyřice dianového ty-
pu a aminopolyethylenoxidu v molárním po-
měru 1 : 0,2 až 2 při teplotě 10 až
120 °C po dobu 0,2 až 60 h, po homogeni-
zaci pokračuje polymerační reakce ještě
po dobu 4 až 24 hod při teplotě 25 až
55 °C, vzniklý produkt se mechanicky up-
raví na požadovanou velikost částic a
promyje se puftrem.

Vynález se týká přípravy imobilizovaných mikrobiálních buněk bakterií, kvasinek, vláknitých hub, rostlinných buněk a enzymů, který spočívá v zabudování připravených buněčných populací a roztoků enzymů do polymerní matrice.

Ve vývoji způsobu přípravy preparátů imobilizovaných enzymů a enzymových systémů představuje imobilizace celých buněk jejich producentů směr, kterému je v současné době věnována pozornost především pro značné funkční a operativní výhody.

Dosud známé způsoby přípravy preparátů imobilizovaných buněk obecně vycházejí z metod imobilizace čistých enzymů a lze je rozdělit do následujících kategorií:

- a/ vazba buňky fyzikálním zachycením v gelu, membráně nebo mikropouzdrů;
- b/ vazba buňky adsorbci na ionex nebo biospecifický adsorbent biologické povahy;
- c/ vazba buňky kovalentní vazbou na pevný nosič;
- d/ vznik stabilních buněčných agregátů.

Žádná z metod uvedených kategorií není ideální a její volba je podřízena druhu imobilizovaného biologického materiálu a řadě dalších kritérií. Obecnou nevýhodou zakotvení buněk na povrchu nosiče je jejich snadný mechanický otěr, snadné uvolňování potomstva v případě reprodukce, zakotvených buněk a ekonomicky nákladná příprava nosiče. Zabudování buněk do matrice určitého polymeru je v případě nejčastěji používaných materiálů provázeno jejich omezenou stabilitou, závislostí na dovozu použitých monomerů, negativními fyziologickými vlivy a negativním vlivem výrazné difúzní bariéry, kterou tyto materiály obvykle vytvářejí. Uvedené nedostatky v imobilizaci celých buněk odstraňuje předkládaný vynález.

Podle vynálezu podstata imobilizace nepermeabilizovaných i permeabilizovaných buněk bakterií, kvasinek, vláknitých hub, buněk rostlinných i roztoků enzymů spočívá v tom, že se mikrobiální, popřípadě rostlinné buňky nebo enzymy zhomogenizují při teplotě 25 až 35 °C s polymerní maticí, připravenou reakcí epoxydové pryskyřice dianového typu a aminopolyethylenoxidu v molárním poměru 1:0,2 až 2 při teplotě 10 až 120 °C po dobu 0,2 až 60 h, po homogenizaci pokračuje polymerační reakce ještě po dobu 4 až 24 hod při teplotě 25 až 35 °C, vzniklý produkt se mechanicky upraví na požadovanou velikost částic a promyje se pufrem. Polymerní matrice je tvořena reakcí 28 až 65 hmot. % epoxydové pryskyřice dianového typu a 70 až 30 hmot. % aminopolyethylenoxidu. Jako epoxydové pryskyřice dianového typu je vhodné použít adiční produkt bisfenolu A a epichlorhydrinu o molekulové hmotnosti 301 až 2 500 a jako aminopolyethylenoxid lze použít α , ω -diaminopolyethylenoxid o molekulové hmotnosti 208 až 2 400. Do polymerní matrice se zabudovává 0,1 až 30 hmot. % aktivní biosložky.

Na epoxydovou složku dianového typu se působí aminopolyethylenoxidem v molárním poměru 1:0,2 až 2, popřípadě v přítomnosti urychlovače polyadiční reakce při teplotě 10 až 120 °C po dobu 0,2 až 60 hodin, to je do vzniku viskózní hmoty předpolymeru, do které se pak zamíchá biologický materiál. Polymerace dále probíhá při teplotě 25 až 35 °C po dobu 4 až 24 hodin. Reakce probíhá při teplotě 10 až 120 °C po dobu 2 až 6 hodin, a to v závislosti na typu složek a jejich poměru.

Nejúčinnějšími urychlovači polyadiční reakce jsou organické dusíkaté látky, jako je guanidin, hydrazin, imidazol, pyridin a jeho deriváty, dále hexamethylentetramin. Použitím uvedených urychlovačů se polymerační doba tvorby polymerní matrice zkrátí řádově 2 až 5x. V tomto prvním stupni se získá silně viskózní hmota předpolymeru, která se ochladí, respektive temperuje při teplotě 30 až 36 °C po dobu 0,5 až 1 hodinu a pak se do takto upravené hmoty přidá suspenze biologického materiálu v pufru a dokonale zhomogenizuje mícháním. Zhomogenizovaná směs ještě dále polymeruje při teplotě 30 až 36 °C po dobu

2 až 24 h, kdy vzniká konečný produkt, jehož tvar odpovídá tvaru formy, resp. nádoby, ve které byl produkt připraven.

Gelovitá hmota obsahující vázaný biologický materiál v polymerní matrici se pak zpracovává na požadovaný tvar řezáním nebo drcením, promyje se pufrem, a tím je připraven preparát imobilizovaného biologického materiálu.

Účinek tohoto způsobu imobilizace celých buněk spočívá ve vyloučení izolace a purifikace enzymů a enzymových systémů a v jejich zachování v intracelulárním prostředí průmyslově významné biochemické aktivity, zaručuje optimální podmínky pro vlastní enzymovou reakci a izolaci enzymu a chrání enzymový systém od negativních vlivů extracelulárního prostředí. Použitý polymerní materiál je fyziologicky inertní, nevytváří výraznou difuzní bariéru, je stabilní v jakémkoliv kultivačním prostředí a v širokém rozsahu teplot a pH. Jeho příprava vychází z firemních materiálů a probíhá ve fyziologicky výhodných podmínkách. Preparát imobilizovaných buněk je možno připravit v libovolném tvaru částic a v žádané velikosti. V případě, že preparát imobilizovaných buněk připravený podle vynálezu je aplikován v prostředí umožňujícím reprodukci zakotvených buněk, je možné částice preparátu pokrýt vrstvou použitého polymeru neobsahujícího buňky a tímto způsobem zamezit uvolňování buněk potomstva zabudované buněčné populace.

Způsob přípravy preparátu imobilizovaných buněk podle vynálezu zajišťuje homogenní distribuci biologického materiálu v celé hmotě polymerní matrice a který je přístupný substrátům rozpuštěným ve vodném prostředí. Polymerní matrice je tvořena hydrofobní a hydrofilní složkou. Strukturu nosiče biologického materiálu, resp. polymerní matrici, je možno modelovat a hustotu sítě upravovat molárním poměrem výchozích složek. Podle druhu a množství vázaného, resp. imobilizovaného biomateriálu se polymerní matrice upravuje tak, aby se biologický materiál neuvolňoval a aby se dosahovalo jeho maximální aktivity.

Mechanické vlastnosti polymerního nosiče se řídí typem výchozích složek, to je hydrofobní a hydrofilní, jejich koncentrací, resp. molárním poměrem a jejich molekulovou hmotností. V závislosti na uvedených podmínkách přípravy polymerního nosiče se jeho mechanické vlastnosti mění od měkké gelovité hmoty až po látku pevné a houževnaté až rohovité konzistence. Mechanické vlastnosti konečného produktu, to je imobilizovaného biologického materiálu jsou též ovlivňovány množstvím imobilizované aktivní složky a množstvím přidaného pufru.

Povrch částic imobilizovaných buněk připravených podle vynálezu je možno sterilovat chemickými a fyzikálně-chemickými prostředky a způsoby.

V dalším je vynález blíže objasněn na příkladech, které však rozsah vynálezu nijak neomezuje.

Příklad 1

10 g adičního bisfenolu A a epichlorhydrinu o molekulové hmotnosti 1 200 a 10 g α, ω -diaminopolyethylenoxidu o molekulové hmotnosti 1 600 bylo smícháno při teplotě 50 °C a směs ponechána při této teplotě po dobu 3 hodin. Viskózní tekutá hmota předpolymeru byla ochlazena na 35 °C a do ní zamíchána suspenze biologického materiálu. Tato zhomogenizovaná směs byla ponechána při 35 °C po dobu 10 hodin. Vzniklý produkt byl zpracován mechanicky na potřebnou velikost částic, promyt puftrem a použit jako preparát imobilizovaných buněk.

Příklad 2

10 g adičního produktu připraveného jako u příkladu 1 o molekulové hmotnosti 301 bylo smícháno se 100 g α, ω -diaminopolyethylenoxidu o molekulové hmotnosti 3 000 při teplotě 60 °C, ostatní jako u příkladu 1.

Příklad 3

10 g adičního produktu připraveného postupem popsaným u příkladu 1 o molekulové hmotnosti 1 200 a 15 g α, ω -diaminopolyethylenoxidu o molekulové hmotnosti 1 700 bylo smí-

cháno při teplotě 60 °C a ponecháno po dobu 3 hodin. Do vzniklé viskózní hmoty předpolymeru ochlazené na 33 °C byla zamíchána suspenze biologického materiálu v pufru a zhomogenizovaná směs byla ponechána po dobu 20 hodin při teplotě 33 °C. Ze vzniklé gelovité fólie o síle 3 mm byly vyřezány válečky o průměru 3 mm a zality do polymerní hmoty připravené postupem popsáním v tomto příkladu, to je do polymerní hmoty bez buněk. Směs byla opět ponechána po dobu 16 hodin při teplotě 33 °C. Z takto připraveného gelu byly mechanicky vypreparovány válečky obsahující buňky, avšak s vnější obalovou polymerní vrstvou matrice bez buněk. Vzniklý produkt byl promyt puftrem a použit jako preparát imobilizovaných buněk.

Příklad 4

10 g adičního produktu bisfenolu A a epichlorhydrinu o molekulové hmotnosti 800 a 11 g α, ω -diaminopolyethylenoxidu o molekulové hmotnosti 500 bylo smícháno při teplotě 50 °C, ostatní postup byl jako u příkladu 1.

Příklad 5

20 g adičního produktu bisfenolu A a epichlorhydrinu o molekulové hmotnosti 1 500 a 25 g α, ω -diaminopolyethylenoxidu o molekulové hmotnosti 1 680 bylo smícháno při teplotě 50 °C, dále bylo pokračováno jako u příkladu 1.

Příklad 6

Postupem uvedeným u příkladu 3 byly imobilizovány 2 g buňčné pasty bakteriálního kmene *Zymomonas mobilis*, převedené do fosfátového pufru pH 7,0. Povrch částic získaného preparátu byl sterilizován ethanolem /90 obj. %/, a to opláchnutím nebo máčením po dobu 25 sekund. Částice preparátu byly přelity kompletním kultivačním médiem neobsahujícím zdroj uhlíku a ponechány botnat při 20 °C 6 h. Částice preparátu byly potom staticky inkubovány v prostředí téhož sterilního média s glukosou při 30 °C, s opakovaným promícháváním náplně použitého reaktoru a pravidelnou výměnou média v intervalu 30 h. Preparát imobilizovaných buněk byl sledován jako producent ethanolu. V tomto uspořádání činila průměrná maximální hladina ethanolu

v médiu 2,6 obj. %, a to po 30 h inkubace použitého preparátu. Kultivační prostředí nebylo kontaminováno volnými buňkami producenta ethanolu.

Příklad 7

Postupem uvedeným v příkladu 3 byly imobilizovány 2,0 g buněčné pasty kvasinkového kmene *Saccharomyces cerevisiae*, převedeno do citranového pufru pH 5,0. Povrch částic získaného preparátu byl sterilizován jako v příkladu 6. Preparát byl použit jako producent ethanolu v uspořádání uvedeném v příkladu 6 s tím rozdílem, že bylo použito kompletní kultivační médium s glukosou pro kvasinkové kmeny. Průměrná maximální hladina ethanolu činila 3,6 obj. % po 30 h kultivace. Kultivační prostředí nebylo kontaminováno volnými buňkami producenta ethanolu.

Příklad 8

Využití untracelulární enzymatické aktivity imobilizovaných buněk je podmíněno jejich permeabilizací, která byla v tomto případě provedena následujícím způsobem: buněčná suspenze byla po 0,1 ml objemech nanášena na střed membránového filtru, přičemž každé následující nanesení bylo provedeno vždy po úplném odsátí média. Po nanesení 1 ml objemu byly filtry přeneseny na skleněnou desku a zachycené buňky byly vystaveny proudu teplého vzduchu o konstantní teplotě 60 °C po dobu 70 s. Permeabilizované buňky byly z povrchu filtrů smyty 0,05 M fosfátovým pufrem /pH 7,0/.

1,5 g vlhké hmoty takto permeabilizovaných buněk bakteriálního kmene *Escherichia coli*, které byly získány kultivací v prostředí laktosy, bylo imobilizováno postupem uvedeným v příkladu 1. Částice preparátu byly přelity fosfátovým pufrem pH 7,0 a ponechány bohnat 4 h. Potom byly staticky inkubovány v prostředí fosfátového pufru pH 7,2 s o-nitrofenyl- β -D-galaktopyranosidem. Specifická aktivita takto připraveného a testovaného preparátu vázané β -galaktosidasy činila při teplotě 37 °C 12,5 μ molu o-nitrofenolu/min/mg vlhké hmoty částice preparátu.

Příklad 9

Suspenze buněk *Kluyveromyces lactis*, které byly získány

kultivací v prostředí s laktosou byla v prostředí citranového pufru pH 5,0 vystavena účinku dimethylsulfoxidu /40 obj. %/ při teplotě 25 °C. Po 30 min kontaktu byly takto permeabilizované buňky promyty pufrem, separovány centrifugací a 1,5 g získané buněčné pasty bylo imobilizováno postupem uvedeným v příkladu 1.

Způsobem popsaným v příkladu 8 byly získané částice testovány jako preparát imobilizované kvasinkové β -galaktosidasy. Specifická aktivita činila 10,5 μ molu o-nitrofenolu/min/mg vlhké částice preparátu.

Příklad 10

Postupem uvedeným v příkladu 3 bylo imobilizováno 1,5 g pasty nepermeabilizovaných buněk *Escherichia coli*, které byly získány kultivací v prostředí glukosy. Částice preparátu imobilizovaných buněk byly povrchově sterilizovány účinkem UV záření a potom přelity tryptosovým médiem a ponechány botnat 5 h při 20 °C. Částice byly potom převedeny do prostředí tryptosového média s isopropylthio- β -D-galaktopyranosidem a za stálého míchání inkubovány při teplotě 37 °C 4 h. Částice preparátu byly separovány a převedeny do fosfátového pufru pH 7,0 s dimethylsulfoxidem /55 obj. %/ a při teplotě 30 °C inkubovány 45 min. Částice byly potom převedeny do pufru bez dimethylsulfoxidu inkubovány 20 min, separovány a čerstvým pufrem promyty. Způsobem popsaným v příkladu 8 byly získané částice testovány jako preparát imobilizované bakteriální β -galaktosidasy, jejíž syntéza byla indukována v již imobilizovaných buňkách. Specifická aktivita preparátu činila 8,2 μ molu o-nitrofenolu/min/mg vlhké hmoty částice preparátu.

Příklad 11

Postupem uvedeným v příkladu 1 byly imobilizovány 2 g vlhké hmoty mycelia *Asperillus oryzae*, které bylo připraveno kultivací v prostředí laktosy a permeabilizováno způsobem uvedeným v příkladu 9. Způsobem popsaným v příkladu 8 byly získané částice testovány jako preparát imobilizované β -galaktosidasy vláknité houby. Specifická aktivita činila 7,6 μ molu o-nitrofenolu/min/mg vlhké hmoty částice preparátu.

Příklad 12

Postupem uvedeným v příkladu 2 byla imobilizována β -galaktosidasa ve formě bezbuněčného extraktu buněk *Escherichia coli* získaných kultivací v přítomnosti laktosy. Bezobuněčný extrakt byl připraven desintegrací buněk, získaný homogenát byl centrifugován a separovaná rozpustná frakce byla imobilizována. Způsobem popsáním v příkladu 8 byly získané částice testovány jako preparát imobilizované technické β -galaktosidasy bakteriálního původu. Specifická aktivita částice činila 5,3 μ molu o-nitrofenolu/min/mg vlhké hmoty částice preparátu.

Příklad 13

Postupem uvedeným v příkladu 3 bylo imobilizováno 1,5 g buněčné pasty kmene *Saccharomyces cerevisiae* X3, který je extracelulárním producentem bílkoviny zymocinu. Získané částice preparátu byly povrchově sterilizovány účinkem UV záření a potom inkubovány v kompletním médiu, jehož složení podmiňuje produkci zymocinu u volných buněk. Částice preparátu byly dále kultivovány za aktivní aerace při 28 °C. Po šesti hodinách kultivace byly částice preparátu odstraněny a filtrát kultivačního média byl testován jako hrubý preparát zymocinu. Aktivita přítomného zymocinu byla stanovena rhodamidovým testem podle Dr. V. Vondřejse. Paralelně byla testována schopnost extracelulární produkce zymocinu u stejného množství buněk téhož kmeny, které nebyly vystaveny procesu imobilizace. Ostatní manipulace s touto buněčnou populací byly identické a stanovená hladina extracelulárního zymocinu byla označena jako 100 %. V této souvislosti hladina zymocinu produkovaného preparátem imobilizovaných buněk producenta odpovídá 75 % hodnoty produkce stanovené v případě volných buněk.

Příklad 14

Postupem uvedeným v příkladu 1 bylo imobilizováno 2,5 g sedimentu rostlinných buněk *Nicotiana tabacum*. Částice preparátu byly přelity médiem podle Murashige a Skoog a ponechány botnat při teplotě 20 °C 5 h. Po 48 h byla provedena mechanická destrukce částic preparátu a hodnocen mikroskopický obraz náhodně uvolněných buněk. Bylo prokázáno, že prostředí poly-

merní matrice nepodmiňuje destrukci buňky ani nevyvolává změny morfologie velkých rostlinných buněk.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob imobilizace mikrobiálních a rostlinných buněk a enzymů do polymerní matrice, vyznačující se tím, že se mikrobiální, popřípadě rostlinné buňky, nebo enzymy zhomogenizují při teplotě 25 až 35 °C s polymerní matricí, připravenou reakcí epoxydové pryskyřice dianového typu a aminopolyethylenoxidu v molárním poměru 1:0,2 až 2 při teplotě 10 až 120 °C po dobu 0,2 až 60 h, po homogenizaci pokračuje polymerační reakce ještě po dobu 4 až 24 hod při teplotě 25 až 35 °C, vzniklý produkt se mechanicky upraví na požadovanou velikost částic a promyje se pufrům.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že částice imobilizovaných buněk nebo enzymů se obalí vrstvou polymerní matrice.
3. Způsob podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že se polymerní matrice připraví reakcí adičního produktu bisfenolu A a epichlorhydrinu o molekulové hmotnosti 301 až 2 500 a α, ω -diaminopolyethylenoxidu o molekulové hmotnosti 208 až 4 000.
4. Způsob podle bodu 1 až 3, vyznačující se tím, že se polymerace provádí v přítomnosti urychlovače polymerace, například guanidinu, hydrazinu, imidazolu, pyridinu nebo hexamethylen-tetraminu.