



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

252 916

(11)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 05 03 86
(21) PV 1506-86.N

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 5/00

(40) Zveřejněno 12 02 87
(45) Vydáno 1.6.1989

(75)
Autor vynálezu

ŠULC JIŘÍ ing.,
KRČOVÁ ZUZANA ing., PRAHA

(54)

Substrát pro pěstování živých tkání a organismů

Syntetický substrát pro pěstování živých tkání a organismů (náhrada agaru), skládající se z multiblokových kopolymerů akrylonitrilu s akrylamidem a/nebo kyselinou akrylovou resp. jejími solemi, s obsahem nejméně 80 %, výhodně nad 95 % vody ve stavu rovnovážného zbotnění při 20 °C, a případně se živinami pro pěstované organismy nebo jejich částí. Práškový substrát se rozpustí za tepla při atmosférickém tlaku ve vodě, ochlazením roztok ztuhne v pružný gel.

Vynález se týká substrátu pro pěstování živých tkání a organismů.

Živými tkáněmi se rozumí části živých rostlin nebo živočichů, případně člověka, tedy jednotlivé buňky nebo více méně organizované soubory buněk. Rostlinami se rozumí všechny organismy od jednobuněčných řas a bakterií přes houby a plísně až po vyšší rostliny telomové včetně jejich částí, jako jsou listy, kořeny, odenky, řízky, očka a kousky tkání až po jednotlivé buňky. Pěstováním se rozumí všechny úkony směřující k uchování, testování a množení těchto organismů včetně klonování a genového inženýrství a podobné biotechnologické postupy. Substráty jsou makromolekulární, při teplotách do 45 °C ve vodě botnající látky, nepoškozující pěstované organismy ani jim nesloužící za potravu, ani jimi nerozkládané, ale tvořící vhodné prostředí obsahující roztoky živin.

Dosud se k těmto účelům používá převážně agar získávaný z mořských rostlin. Mají v čistém stavu všechny požadované vlastnosti a dá se zahřátím reverzibilně rozpustit ve vodě a tak odlévat, přičemž ochlazením ztuhne v gel, který při vhodném obsahu vody má dostatečnou soudržnost, avšak neklade přílišný odpor prorůstajícím částím pěstovaných organismů. Jeho nevýhodou je však poměrně omezené množství vyskytující se v přírodě a poměrně obtížné čištění, z čehož vyplývá i nynější vysoká cena (v roce 1985 asi 40 U.S. dol. nebo 100 DM za 1 kg).

Agar - původní malajský název agar-agar - je polysacharid, jehož dlouhé makromolekuly nejsou zesítěné chemicky, nýbrž jen fyzikálně. Je fyziologicky neškodný, a proto se používal i v potravinářském průmyslu.

Bylo nyní zjištěno, že podobné vlastnosti jako agar mají i multiblokové kopolymeru akrylonitrilu s akrylamidem, obsahující

případně jisté množství jednotek kyseliny akrylové, resp. jejich solí s fyziologicky neškodnými kationty, hlavně sodíkovými, pokud jsou silně botnavé, zhruba nad 80 %, výhodně nad 95 % obsahu vody při rovnovážném zbotnání při 20 °C. Protože se tyto hydrogely zpravidla připravují kontrolovanou hydrolýzou poly(akrylonitrilu) kyselinou sírovou nebo dusičnou takové koncentrace, že se v nich poly(akrylonitril) aspoň za tepla rozpouští, znamená to, že jde o kopolymery s poměrně vysokým stupněm hydrolýzy.

Tyto syntetické hydrogely se dají snadno připravit ve velmi čistém stavu v jakémkoli množství a jsou poměrně levné, podstatně levnější než agar. Jejich termoreversibilní rozpustnost ve vodě nebyla dříve pozorována ani zmíněna v literatuře. Termoreversibilní gely z multiblokových kopolymerů akrylonitrilu s akrylamidem a/nebo kyselinou akrylovou byly dosud připravovány jen za použití směsi rozpouštědla poly(akrylonitrilu) (například dimethylsulfoxidu) se srážedlem (například glycerolem), viz například čs. A0 178 638 a 179 179. V patentové literatuře se vyskytl i údaj o rozpustnosti polyakrylonitrilu v samotné vodě při teplotách nad 180 °C pod tlakem v autoklávu, správnost tohoto údaje alespoň pro polymery v obvyklém používaném rozsahu molekulárních hmotností se však nepodařilo ověřit. Multiblokové kopolymery akrylonitrilu, obsahující výrazné, rentgenograficky snadno zjistitelné domény poly(akrylonitrilu), se k rozpouštědlům chovají stejně jako samotný poly(akrylonitril), a proto je zjištění rozpustnosti některých z nich v horké vodě za atmosférického tlaku překvapující. Bylo totiž nutné předpokládat, že se jako poly(akrylonitril) sám budou rozpouštět jen ve vysoce polárních rozpouštědlech, jako je dimethylsulfoxid, dimethylformamid, silně koncentrovaná kyselina dusičná nebo sírová a koncentrované vodné roztoky některých solí, jako je chlorid zinečnatý, rhodanid sodný nebo vápenatý nebo bromid lithný, ne však v samotné vodě za atmosférického tlaku. Proto také byly v dostupné literatuře tyto multiblokové kopolymery obvykle označovány jako "ve vodě nerozpustné, vodou botnající gely".

Substráty podle vynálezu lze snadno připravit v čisté formě též v podobě suchého prášku, ve studené vodě silně botnajícího a v horké vodě dobře rozpustného na odlévatelné, ochlazením tuhnoucí roztoky podobně jako agar. Prášková forma je velmi vhodná pro dopravu, skladování a pohodlnou rychlou aplikaci. Proti agaru má syntetický gel popsaného typu i tu výhodu, že zvolením vhodných

podmínek při výrobě lze vlastnosti, jako botnavost, teplotu rozpouštění a tuhost ochlazeného gelu i obsah kyselých, kationty vázajících skupin přizpůsobit speciálním požadavkům spotřebitelů. Fyzikální vlastnosti výsledného gelu závisí ve velké míře na koncentraci kopolymeru ve vodném horkém roztoku.

Příklad 1

20 hmot. dílů akrylonitrilu bylo rozpuštěno v 80 dílech bezbarvé kyseliny dusičné 65%ní, přidány 0,3 díly močoviny rozpuštěné v minimálním množství vody a 0,2 díly 10%ního vodného roztoku persíranu amonného. Dobře promíchaný roztok byl ponechán pod dusíkem 12 dnů při teplotě místnosti a potom vytlačen tlakovým dusíkem otvorem 6 mm průměru do studené vody. Koagulovaný kopolymer byl vyprán napřed vodou z vodovodu a nakonec deionizovanou vodou do neutrální reakce. Silně zbotnalá hmota byla odkapáním na sítu zbavena přebytečné vody a roztavena zahříváním. Roztok byl zčásti přímo nalit do Petriho misek, kde ztuhnul na gel přímo použitelný jako substrát, zčásti převeden v rozprašovací sušárně na prášek snadno rozpustný v horké vodě.

Příklad 2

10 hmot. dílů poly(akrylonitrilu) průměrné molekulové hmotnosti 150.000 v podobě jemného prášku se rozmíchá při teplotách pod 5 °C v 80%ní kyselině sírové na homogenní suspenzi, načež se teplota zvýší za stálého míchání na 30 °C po dobu 3 hodin. Potom se nalije tenkým proudem do přebytku studené vody. Po vyprání vodou z vodovodu do zmizení kyselé reakce se ještě promyje deionizovanou vodou, zbotnalý gel se oddělí a vysuší. Po rozemletí se získá bílý prášek, který lze opět rozpustit za tepla ve vodě. Odlitím roztoku a ochlazením na teplotu okolí se získá průhledný, pružný gel. Podle potřeby lze při přípravě roztoku použít místo čisté vody roztoky obvyklých živin podle účelu, ke kterému se má substrát použít.

V uvedených příkladech lze kyselinu dusičnou nebo sírovou zcela nebo zčásti nahradit i 99 až 100%ní kyselinou orthofosforeč-

nou, nebo lze použít libovolných směsí uvedených minerálních kyselin.

Má-li kopolymer obsahovat velké množství skupin kyseliny akrylové, lze použít částečné alkalické hydrolýzy poly(akrylonitrilu) v koncentrovaných roztocích rodanidu sodného podle čs. AO č. 179 567.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Substrát pro pěstování živých tkání a organismů, vyznačený tím, že se skládá z multiblokového kopolymeru akrylonitrilu s akrylamidem a/nebo kyselinou akrylovou nebo jejími solemi, s botnavostí nad 80 %, výhodně nad 95 % vody při rovnovážném zbotnání při 20 °C, rozpustného za tepla ve vodě při atmosférickém tlaku a tuhnutího ochlazením získaného roztoku na pružný gel, s případným obsahem obvyklých živin.