



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

201786
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/38

(22) Přihlášeno 14 09 78
(21) (PV 5945-78)

(40) Zveřejněno 31 03 80

(45) Vydáno 15 02 83

(75)
Autor vynálezu

JIRKŮ VLADIMÍR RNDr. CSc., PRAHA, TURKOVÁ JAROSLAVA ing.
CSc., ČESKÝ BROD, KRUMPHANZL VLADIMÍR prof. ing. DrSc., FRYD-
RYCHOVÁ ANNA ing. a ČOUPEK JIRÍ ing. CSc., PRAHA

(54) Způsob imobilizování β -galaktosidasy

Vynález se týká způsobu imobilizace kvasinkové β -galaktosidasy, který spočívá v zakotvení celé buňky jejího producenta kovalentní vazbou na pevný nosič.

Průmyslová aplikace vázané β -galaktosidasy nalézá značné uplatnění v procesu úpravy mléka i při degradaci odpadních produktů obsahujících laktózu. V této souvislosti je použití kvasinkové β -galaktosidasy výhodnější jednak tím, že optimální pH enzymu je bližší pM mléka, jednak tím, že aktivita kvasinkové β -galaktosidasy je v prostředí mléka stabilnější.

Ve vývoji způsobů přípravy vázaných enzymů představuje imobilizace celých buněk jejich producentů nový směr, kterému je v současné době věnována pozornost především pro značné operační výhody.

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

- vazba buňky fyzikálním zachycením v gelu, membráně nebo mikropouzdrů;
- vazba buňky adsorpcí na ionex nebo biospecifický adsorbent biologické povahy;
- vazba buňky kovalentní vazbou na pevný nosič.

Výhody a nevýhody těchto známých způ-

sobů hodnotí z hlediska aplikace vázaných buněk poměrně málo prací. Je však zřejmé, že imobilizací celých buněk kovalentní vazbou je možno získat zakotvený enzymatický systém, jehož aktivita nebude negativně ovlivněna difúzní bariérou nebo dalšími negativními vlivy, které se projevují při použití způsobů, kdy se vazba buňky provádí fyzikálním zachycením nebo adsorpcí na ionexu. Z těchto důvodů je imobilizace buňky kovalentní vazbou na pevný nosič velmi perspektivní.

Podle vynálezu spočívá způsob imobilizace kvasinkové β -galaktosidasy v zakotvení permeabilizované kvasinkové buňky na hydroxyalkyl metakrylátový gel prostřednictvím triethylentetraminu, který byl aktivován glutaraldehydem nebo karbodiimidem. Synthesa β -galaktosidasy byla v těchto buňkách indukována před imobilizací.

Účinek tohoto způsobu imobilizace β -galaktosidasy spočívá ve vyloučení izolace a purifikace enzymu a v jeho zachování v intracelulárním prostředí buňky, což přispívá ke stabilitě jeho aktivity, zaručuje optimální podmínky pro vlastní enzymatickou reakci a izoluje enzym od negativních vlivů extracelulárního prostředí.

Způsob podle vynálezu je dále blíže vysvětlen na několika příkladech provedení.

Příklad 1

Hydroxyalkyl metakrylátový gel (8 až 13 μm), zpracovaný epichlorhydrinem, byl modifikován vazbou triethylentetraminu podle následujícího postupu: 1 g gelu byl suspendován v 10 ml 1 M triethylentetramin dihydrochloridu, jehož pH bylo upraveno 1 M NaOH na hodnotu pH 9,0. Po 24 hod míchání za laboratorní teploty byla suspenze převedena do kolonky a gel byl promýván vodou až do vyrovnání vodivosti. Potom byl gel promyt desetinasobným objemem ethanolu, butanolu a opět ethanolu a vysušen. Obsah triethylentetraminu byl vypočten na základě stanovení dusíku Kjeldahlovou metodou na 256 $\mu\text{mol/g}$ suchého gelu. Modifikovaný gel (1 g) byl po 3 hod bobtnání ve vodě promyt několikanásobným objemem vody. Odsátý gel byl suspendován ve dvojnásobném objemu vody a k vzniklé suspensi byl přidán glutaraldehyd (25 %) do konečné koncentrace 5 %. Po 1 hod míchání byl gel převeden do kolonky a promýván vodou až do negativní reakce, kterou byla sledována přítomnost glutaraldehydu v jednotlivých promývkách. Po vymytí volného glutaraldehydu byl gel promyt 300 ml 0,05 M fosfátového pufru (pH 7,0). Takto připravený gel (0,5) byl přidán do 5 ml buněčné suspenze, obsahující v 1 ml téhož pufru 10^9 permeabilizovaných buněk kmene *Kluyveromyces lactis*. Z hlediska přechodu β -galaktosidasové aktivity na nosič a její stability bylo konstatováno, že imobilizace buněk pevnou kovalentní vazbou byla v podmínkách míchané suspenze dokončena v teplotě 20 °C přibližně po 100 hodinách. Lokalizace buněk na povrchu zmíněného nosiče je dokumentována mikrofotograficky.

Využití intracelulární 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 objemů byly filtry přeneseny na skleněnou desku a zachycené buňky byly vystaveny proudu teplého vzduchu o konstantní teplotě 60 °C po dobu 70 sek. Permeabilizované buňky byly z povrchu filtrů smyty 0,05 M fosfátovým pufrům (pH 7,0).

Příklad 2

Příprava zakotvených permeabilizovaných buněk byla provedena způsobem popsaným v příkladu 1 s tím rozdílem, že k vazbě místo triethylentetraminu byl použit hexamethylen-tetramin.

Příklad 3

Příprava zakotvených permeabilizovaných buněk byla provedena způsobem popsaným v příkladu 1 a 2 s tím rozdílem, že bylo použito buněk permeabilizovaných dimethylsulfoxidem. Suspenze buněk v 0,05 M fosfátovém pufru (pH 7,0) byla vystavena účinku dimethylsulfoxidu (40 %) při teplotě 20 °C. Po 30 min byly buňky promyty, resuspendovány v uvedeném pufru a imobilizovány.

Příklad 4

Postupem uvedeným v příkladu 1 a 2 byly zakotveny nepermeabilizované buňky. Takto zakotvené buňky byly dodatečně permeabilizovány postupem uvedeným v příkladu 1 s tím rozdílem, že bylo použito suspenze nosiče s navázanými buňkami.

Příklad 5

Příprava zakotvených buněk byla provedena způsobem popsaným v příkladu 1 s tím rozdílem, že modifikovaný gel byl během imobilizace aktivován přítomností 100 mg N-ethyl-N'-/3-dimethylaminopropyl/karbodiimidu na 100 mg nosiče.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob přípravy imobilizovaný β -galaktosidasy kovalentní vazbou intatní kvasinkové buňky na pevný nosič, vyznačený tím, že permeabilizovaná nebo nepermeabilizovaná kva-

sinková buňka se při teplotě 20 °C zakotví pomocí triethylentetraminu na povrch partikulí hydroxyalkyl metakrylátového gelu.