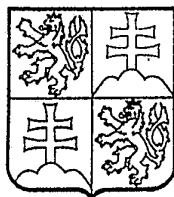


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

272 660

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 12 N 11/02

(21) PV 4553-87.S

(22) Přihlášeno 22 06 87

(40) Zveřejněno 13 06 90

(45) Vydáno 25 11 91

(75) Autor vynálezu

ŠILHÁNKOVÁ LUDMILA doc. ing. CSc.,
OČENÁŠKOVÁ KATEŘINA ing.,
MACHOVÁ-KOVÁŘOVÁ ZORA ing., PRAHA

(54)

Imobilizovaný biokatalyzátor pro enzymovou redukci
nikotinamidadeninukleotidu a způsob jeho přípravy

(57)

Imobilizovaný biokatalyzátor pro enzymovou redukci nikotinamidadeninukleotidu obsahuje 1 až 60 hmot. dílů vlhkých permeabilizovaných buněk *Arthrobacter ureafaciens*, s výhodou *Arthrobacter ureafaciens* DBM 1076 uloženého ve sbírce mikroorganismů katedry biochemie a mikrobiologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze pod číslem 1076, na 1 hmot. díl sušiny gelotvorné látky, například alginátu, akrylamidu, agaru, kapparrageenanu a genu-carrageenanu. Způsob přípravy imobilizovaného biokatalyzátoru spočívá v tom, že se vlhké promyté bakteriální buňky popřípadě permeabilizované suspendují do roztoku gelotvorné látky, načež se suspenze převede v gel srážením, polymerací a/nebo ochlazením a popřípadě se provede permeabilizace imobilizovaných buněk.

Vynález se týká imobilizovaného biokatalyzátoru pro enzymovou redukci nikotinamidadenindinukleotidu (NAD^+) v jeho redukovanou formu (NADH) a způsobu jeho přípravy.

Redukovaný nikotinamidadenindinukleotid se používá při enzymovém stanovení řady organických sloučenin, v biochemickém výzkumu a při enzymové přípravě některých organických sloučenin. Zatímco nikotinamidadenindinukleotid je většinou připravován izolací z buněk kvasinek, jeho redukováná forma se získává redukcí izolovaného nikotinamidadenindinukleotidu. Nejčastěji je používána redukce pomocí imobilizovaných čistých enzymů, např. alkoholdehydrogenasy (E.C.1.1.1.1.), malátdehydrogenasy (E.C.1.1.1.37, E.C.1.1.1.38, nebo E.C.1.1.1.39) nebo formátdehydrogenasy (E.C.1.2.1.2.) za použití příslušných enzymových substrátů, jako donoru vodíku. Použití imobilizovaných enzymů pro tento proces vyžaduje technicky i ekonomicky náročnou izolaci příslušných enzymů, jejichž stabilita je značně omezená. Proto bylo navrženo použití celých, permeabilizovaných nebo rozdrčených buněk mikroorganismů jako zdroje příslušných dehydrogenas, případně hydrogenas pro enzymovou redukci nikotinamidadenindinukleotidu. Isuzumi Y. a sp. (J. Ferment. Technol. 61, 135, 1983) používají k tomuto účelu permeabilizované buňky mikroorganismů s vysokou aktivitou formátdehydrogenasy, avšak k proběhnutí redukce je zapotřebí poměrně dlouhá doba (3 hod. pro redukci 60 % přítomného nikotinamidadenindinukleotidu), což vede k částečnému rozkladu vzniklého produktu ve sloučeniny, jež inhibují reakce dehydrogenas, čímž se redukováný nikotinamidadenindinukleotid znehodnocuje. Z přidaného mravenčanu, sloužícího zde jako donor vodíku, se při použitím pH uvolňuje těkavá mravenčí kyselina, působící korozivně na zařízení a dráždivě na sliznice pracovníků. U rozdrčených buněk *Achromobacter parvulus* (Yokoyama S. a Suye S., franc. patent 2562089) je pro redukci 98 % přidaného nikotinamidadenindinukleotidu zapotřebí dokonce 6 h. Také enzymová hydrogenace nikotinamidadenindinukleotidu v jeho redukovanou formu plyným vodíkem za součinnosti imobilizovaných bakteriálních buněk (Klibanov A.M. a sp., Biotechnol. Letters 2, 445, 1980, Matsunaga T. a sp., Biotechnol. Bioeng. 27, 1277, 1985) vyžaduje 5 až 6 h při velmi nízkých koncentracích produktu 0,8 mM. Přitom je u tohoto postupu velmi náročná manipulace s plyným vodíkem, jenž se v modifikaci popsané Matsunagem a sp. používá dokonce za tlaku 10 MPa.

Uvedené nevýhody odstraňuje biokatalyzátor pro enzymovou redukci nikotinamidadenindinukleotidu podle vynálezu, který obsahuje 1 až 60 hmot. dílů vlhkých permeabilizovaných buněk bakterie *Arthrobacter ureafaciens* Krebs a Eggleston, s výhodou *Arthrobacter ureafaciens* DBM 1076, uložené ve sbírce katedry biochemie a mikrobiologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze pod číslem 1076, na 1 hmot. díl gelotvorné látky například alginátu, akrylamidu, agaru, kapa-carrageenanu nebo genu-carrageenanu.

Způsob přípravy biokatalyzátoru podle vynálezu spočívá v tom, že se vlhké, popřípadě permeabilizované buňky *Arthrobacter ureafaciens* suspendují do roztoku gelotvorné látky, načež se suspenze převede v gel vysrážením, polymerací a/nebo ochlazením, popřípadě se pak provede permeabilizace buněk. Permeabilizaci je vhodné provádět třepáním s acetonem nebo jiným rozpouštědlem, působením povrchově aktivní látky, například dodecylsulfátem nebo opakovaným zmrazováním buněk. Takto připravený biokatalyzátor se použije v přítomnosti fosfátu a metabolizovatelných sacharidů, jakožto jediného zdroje vodíku k enzymové redukci rozpouštěného nikotinamidadenindinukleotidu v jeho redukovanou formu. Biokatalyzátor může být použit vsádkově v reaktoru za mírného míchání nebo v koloně s průtokem reakční směsi. Může být používán opakovaně, neboť si zachovává aktivitu po dobu 7 až 14 dnů.

Hlavní výhodou imobilizovaného biokatalyzátoru je jeho mimořádně vysoká aktivita, jež umožňuje například redukci trojnásobného množství (počítáno na objem hydratovaného katalyzátoru) 20 mM nikotinamidadenindinukleotidu během 1 h s výtěžkem 90 až 95% redukováného nikotinamidadenindinukleotidu. Další výhodou tohoto biokatalyzátoru je jeho vysoká stabilita, takže může být používán kontinuálně nebo opakovaně po dobu 14 dnů i více, což vede k úsporám na přípravě mikrobiálních buněk i biokatalyzátoru. Mimořádně výhodné je, že biokatalyzátor podle vynálezu umožňuje použití metabolizovatelných sacharidů jako donoru vodíku

při enzymové redukci, což předčí ostatní postupy po ekonomické a v některých případech také hygienické stránce.

Vynález je v dalším blíže objasněn v příkladech provedení, aniž by se jimi omezoval.

Příklad 1

Arthrobacter ureafaciens DBM 1076 se aerobně kultivuje při 30° C v prostředí o pH 7,2 obsahujícím v 1 litru: 20 g glukosy, 1,0 g (NH₄)₂SO₄, 0,1 g MgSO₄·7 H₂O, 8,7 g K₂HPO₄, 10 g sušeného kvasničného autolyzátu a 10 g peptonu. Po 18 h kultivace se buňky odstředí při 800 g a promyjí vodou. 15 g vlhkých buněk se rozmíchá v 30 ml v 1,5 % (hmot./obj.) vodného roztoku alginátu sodného a takto vzniklá suspenze se kape pomocí stříkačky do 0,05 M CaCl₂ obsahujícího 10 % (hmot./obj.) glukosy. Pak se srážecí roztok odstraní filtrací přes skleněnou fritu a imobilizované buňky se na fritě promyjí 0,05 M roztokem CaCl₂ v Tris-HCl pufru o pH 9,0. Promyté imobilizované buňky se míchají 15 min v dvojnásobném objemu acetonu, načež se aceton slije a jeho zbytky se odstraní proudem vzduchu. Takto připravený biokatalyzátor se přidá k trojnásobnému množství (hmot./obj.) reakční směsi obsahující (v konečných koncentracích) 20 mM nikotinamidadenindinukleotid, 40 mM MgCl₂, 0,05 M CaCl₂, 1 mM NaN₃, 1 % (hmot./obj.) kyseliny metafosforečné zneutralizované pomocí 1N NaOH a 2 % (hmot./obj.) glukosy v Tris-HCl pufru o pH 9,0 a inkubuje se za mírného míchání 1 h při 30° C. Pak se reakční kapalina oddělí od biokatalyzátoru filtrací přes fritu a z filtrátu se některým ze známých postupů izoluje redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu. Biokatalyzátor se použije pro další podíl reakční směsi. Jeho stabilita zůstává zachována po dobu 7 až 14 dnů.

Příklad 2

Buňky *Arthrobacter ureafaciens* DBM 1076 se získají postupem uvedeným v příkladu 1 a promyjí vodou. K 10 g vlhkých buněk se přidá 20 ml destilované vody, 4 g monomeru akrylamidu a 0,4 g N,N'-metylen-bis-akrylamidu a po rozmíchání se nechá ztuhnout při teplotě 7 až 12° C. Z této hmoty se nařežou krychličky o hraně 2 až 3 mm, jež se pak míchají 15 min s dvojnásobným objemem acetonu, aby se imobilizované buňky permeabilizovaly. Pak se aceton slije, získaný biokatalyzátor se promyje vodou a naplní do kolony, kterou se poté nechá protékat reakční směs stejného složení jako v příkladu 1. Rychlost průtoku reakční směsi se volí tak, aby se veškerá reakční směs v koloně vyměnila během 45 až 70 min. Tento kontinuální způsob může probíhat až 14 dnů a může být také kdykoliv přerušen a znovu obnoven. Výťažnost redukovaného nikotinamidadenindinukleotidu je kolem 95 % vneseného nikotinamidadenindinukleotidu. Z eluátu se izoluje redukovaný nikotinamidadenindinukleotid některým ze známých postupů.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Imobilizovaný biokatalyzátor pro enzymovou redukci nikotinamidadenindinukleotidu v redukované formě, vyznačující se tím, že obsahuje 1 až 60 dílů hmot. vlhkých permeabilizovaných buněk *Arthrobacter ureafaciens*, s výhodou *Arthrobacter ureafaciens* DBM 1076 uloženého ve sbírce mikroorganismů katedry biochemie a mikrobiologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze pod číslem 1076, na 1 díl hmot. sušiny gelotvorné látky, například alginátu, akrylamidu, agaru, kapa-carageenanu a genu-carrageenanu.
2. Způsob přípravy imobilizovaného biokatalyzátoru podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vlhké promyté bakteriální buňky popřípadě permeabilizované suspendují do roztoku gelotvorné látky, načež se suspenze převede v gel srážením, polymerací a/nebo ochlazením a popřípadě se provede permeabilizace imobilizovaných buněk.