

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

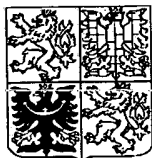
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1454-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **24. 10. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **25.10.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/9613077**

(33) Země priority: **FR**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11. 08. 99**
(Věstník č. 8/99)

(86) PCT číslo: **PCT/FR97/01913**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/18941**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/55
C 12 P 11/00
C 12 M 1/40

(71) Přihlašovatel:

RHONE-POULENC NUTRITION ANIMALE,
Antony, FR;

(72) Původce:

Favre-Bulle Olivier, Lyon, FR;
Pierrard Jérôme, Lyon, FR;
David Christophe, Lyon, FR;
Morel Philippe, Chuzelles, FR;
Horbez Dominique, Franconville, FR;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob přípravy 2-hydroxy-4-metylmáse-
né kyseliny pomocí nitrilázy a zařízení
k přípravě této kyseliny

(57) Anotace:

Způsob přípravy kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomásečné /HMTBA/ nebo amonné soli kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomásečné /HMTBS/ enzymatickou hydrolýzou 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitrilu, spočívající v tom, že a/ se připraví biologický materiál, který má nitrilázovou aktivitu, b/ uvedený biologický materiál se imobilizuje, c/ 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitril se vystaví působení takto imobilizovaného biologického materiálu, aby se získala amonná sůl kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomásečné, a d/ případně se takto získaná sůl přemění na odpovídající kyselinu.

CZ 1454-99 A3

Způsob přípravy 2-hydroxy-4-metylmásečné kyseliny pomocí nitrilázy a zařízení k přípravě této kyseliny

Oblast techniky

Vynález se týká nového způsobu přípravy kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiobutanové (HMTBA) a/nebo jejích amonných solí (HMTBS).

Dosavadní stav techniky

Kyselina 2-hydroxy-4-metylthiomásečná a její soli se užívají již dlouho pro výživu zvířat jako náhražka za methionin, neboť jsou výhodně v kapalně formě, což usnadňuje využití ve firmách vyrábějících krmiva.

Příprava kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiobutanové chemickou cestou je známa již dávno. Evropské patenty EP 142 488 a EP 143 000 popisují hydrolýzu 2-hydroxy-4-metylthiohydroxy-butyronitrilu (HMTBN) ve dvoufázovém procesu. První fáze spočívá v tom, že se působí na 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitril silnou anorganickou kyselinou jako je např. kyselina chlorovodíková nebo kyselina sírová. V následující fázi, po naředění vodou, se dokončí hydrolýza při zvýšené teplotě. Kyselina 2-hydroxy-4-metylthiobutanová se pak extrahuje organickým rozpouštědlem, které není dobře mísitelné s vodou, jako je např. keton, výhodně metylisobutylketon, a rozpouštědlo se pak odstraní odpařením. Avšak tento způsob výroby, který se využívá v průmyslu, má některé nevýhody. Zvláště tu, že je produkováno značné množství síranu amonného, přinejmenším odpovídající látkovému množství vneseného nitrilu, který se musí odstraňovat, a tak se vytváří průmyslový odpad, což není v souladu s politikou

ochrany životního prostředí. Tento způsob výroby navíc vyžaduje velké množství rozpouštědla, které se musí recyklovat.

Jiné způsoby, např. popsané v patentech USA č. 3 773 927 a 4 353 924, spočívají v hydrolýze 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitrilu kyselinou chlorovodíkovou a pak koncentraci média a separaci vytvořeného chloridu amonného. Je obtížné odstranit sůl stejně jako v předchozím zmíněném případě a navíc vzniklá kyselina má silné zabarvení.

Způsob přípravy chemickou hydrolýzou metylthiohydroxypropionitrilu, který spočívá, podobně jako předchozí způsoby, v provedení hydrolýzy v prostředí se sírou, je popsán v evropském patentu č. 330 521: Směs se částečně neutralizuje hydroxidem amonným a pak následuje dvoufázová separace. Organická fáze obsahuje většinu kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomásečné a vodná fáze obsahuje většinu vzniklého síranu amonného. Organický roztok se, po odpaření vody, kterou také obsahuje, filtruje, aby se odstranil rozpuštěný síran amonný. Kyselina 2-hydroxy-4-metylthiobutanová se pak naředí malým množstvím vody a stabilizuje malým množstvím kyseliny sírové. Vodný roztok, po eliminaci vody, umožňuje získat síran amonný, který lze přímo uplatnit na trhu. Takže tento způsob částečně odstraňuje nevýhody způsobů podle předchozího stavu techniky, alespoň co se týče použití organických rozpouštědel, ale neřeší vůbec problém spojený s odstraněním anorganických solí.

Mezi patenty týkajícími se solí kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomásečné je třeba uvést patenty USA č. 2 745 745, 2 938 053 a 3 175 000, které se týkají vápenatých a amonných solí. Na směs získanou hydrolýzou 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitrilu se působí hydroxidem vápenatým nebo uhličitánem vápenatým. Síran vápenatý se pak vysráží, což vede k uvolnění

hydroxidu amonného, který vytvoří amonnou sůl kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomásečné. Ale opět zde je problém odstranit síran vápenatý, který zůstává.

Způsob, jak je popsán v prvním výše citovaném patentovém dokumentu, spočívající v provedení hydrolýzy a extrakce organickým rozpouštědlem a pak neutralizaci organického rozpouštědla hydroxidem amonným, je také popsán v mezinárodní patentové přihlášce WO 96/01808. Tento způsob, tak jako většina způsobů dříve popsaných, vede ke vzniku látkového množství 1 mol síranu amonného na každý 1 mol do reakce vstupujícího nitrilu a navíc vyžaduje recyklování velkého množství organického rozpouštědla. Takže není možné tímto způsobem získat roztok amonné soli kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomásečné při vynaložení průmyslově výhodných nákladů.

Použití nitrilázy jako katalyzátoru hydrolýzy nitrilové skupiny na karboxylovou skupinu je poprvé popsáno jako vynález v patentové přihlášce USA č. 08/809 184, podané 20. března 1997. Tento proces však není vhodný pro využití v průmyslovém měřítku vzhledem k nedostatečné aktivitě mikroorganismů, které syntetizují nitrilázu.

Podstata vynálezu

V současnosti bylo zjištěno, jak popisuje předkládaný vynález, že je možné získat kyselinu 2-hydroxy-4-metyl-thio-butanovou a/nebo její amonnou sůl enzymatickou cestou v průmyslovém měřítku, s vysokým výtěžkem, bez použití rozpouštědel a bez průvodní produkce anorganických solí.

Předmětem předkládaného vynálezu je proto způsob přípravy kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomásečné (HMTBA) a/nebo amonné soli kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomásečné (HMTBS)

enzymatickou hydrolýzou 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitrilu, spočívající v tom, že

- a) v prvním kroku se připraví biologický materiál, který má nitrilázovou aktivitu,
- b) v druhém kroku se imobilizuje uvedený biologický materiál,
- c) ve třetím kroku se 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitril vystaví působení imobilizovaného biologického materiálu, aby se získala amonná sůl kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomásečné,
- d) ve čtvrtém kroku se sůl získaná podle bodu c) volitelně přemění na odpovídající kyselinu a
- e) v pátém kroku se produkt získaný podle odstavce c) nebo d) koncentruje.

Popis obrázků

Na obrázky, které jsou v následující části popsány, se odkazuje v průběhu podrobného popisu předkládaného vynálezu.

Obr. 1 představuje schematické znázornění elektrodialyzační buňky použité ve volitelné fázi d), přičemž obr. 1A je elektrodialyzační buňka s bipolární membránou, která má tři oddíly a obr. 1B představuje elektrodialyzační buňku s bipolární membránou a dvěma oddíly.

Obr. 2 je schema průmyslového zařízení k provádění způsobu podle předkládaného vynálezu.

Obr. 3 je restriční mapa plazmidu pRPA-BCAT 1 až 5.

Obr. 4 znázorňuje strategii sekvencování fragmentu velikosti 1130 bp obsahujícího sekvenci DNA (na obrázku označena nitB) kódující polypeptid, který má nitrilázovou aktivitu podle předkládaného vynálezu. Číslo se týká identifikace primerů použitých pro sekvencování a také označení M13FWD a M13REV.

Obr. 5 je restrikční mapa plazmidů pRPA-BCAT12 a pRPA-BCAT13.

Obr. 6 ukazuje výsledky elektroforézy na 10% SDS-PAGE gelu: exprese sekvencí DNA podle předkládaného vynálezu ve kmenech *E. coli* BL21(DE3)/pRPA-BCAT12, BL21(DE3)/pRPA-BCAT13, BL21(DE3)/pRPA-BCAT12+pXL2231 a BL21(DE3)/pRPA-BCAT13+pXL2231. Každá dráha odpovídá množství 10 µg rozpustných proteinů a případně ekvivalentnímu objemu hrubé a nerozpustné frakce.

Obr. 7 ukazuje výsledky elektroforézy na 10% SDS-PAGE gelu: exprese sekvencí DNA podle předkládaného vynálezu ve kmenech *E. coli* DH5α/pRPA-BCAT3, DH5α/pRPA-BCAT6, DH5α/pRPA-BCAT6+pXL2035, RPA-BIOCAT76. Každá dráha odpovídá množství 10 µg rozpustných proteinů a případně ekvivalentnímu objemu hrubé a nerozpustné frakce.

Obr. 8 je restrikční mapa plazmidu pRPA-BCAT14.

Obr. 9 ukazuje výsledky elektroforézy na 10% SDS-PAGE gelu: exprese sekvencí DNA podle předkládaného vynálezu ve kmenech *P. putida* G2081(pRPA-BCAT14), G2081(pRPA-BCAT23), G2081(pRPA-BCAT24), kmenech *A. faecalis* ATCC8750(RPA-BCAT14), ATCC8750(RPA-BCAT23), ATCC8750(RPA-BCAT24). Každá dráha odpovídá množství 10 µg rozpustných proteinů a případně ekvivalentnímu objemu hrubé a nerozpustné frakce.

Obr. 10 představuje restriční mapu plazmidu pCGL1087.

Obr. 11 je restriční mapa plazmidu pOS48.7.

Podrobný popis vynálezu

První krok způsobu přípravy kyseliny 2-hydroxy-4-methylthiomásečné je příprava biologického materiálu, který má nitrilázovou aktivitu. Biologický materiál může obsahovat vlastní enzymatický roztok jako takový anebo celé buňky nebo části buněk mající nitrilázovou aktivitu.

Výhodně se použije mikroorganismus exprimující nitrilázu. Nitriláza může být z mikroorganismu, zvláště pak z mikroorganismu rodu *Alcaligenes*, *Rhodococcus* nebo *Gordona*, výhodně se jedná o *Alcaligenes faecalis*, *Rhodococcus* sp. HT 29-7 a *Gordona terrae*, a výhodněji jde o kmeny popsané v patentové přihlášce USA č. 08/809 184.

Výhodně se použije mikroorganismus, který exprimuje nitrilázovou aktivitu, získaný přenosem genetické informace kódující nitrilázu rodičovského organismu do hostitelského mikroorganismu. Konkrétně je možné užít kmene *E. coli*, který koexprimuje chaperonový protein GroESL, ke zvýšení výkonnosti rekombinantního kmene. K tomu účelu je možné použít jakýkoliv vhodný vektor, zvláště pak plazmidový vektor.

Nukleotidová sekvence použitá v tomto případě se umístí pod kontrolu signálů, které umožňují její expresi v hostitelské buňce. Hostitelské buňky se mohou vybrat buďto z prokaryotických systémů jako jsou např. Gram-pozitivní nebo gram-negativní bakterie, nebo eukaryotických systémů jako jsou např. kvasinky, houby, nebo i jakékoliv další systémy. Signály pro řízení exprese se vyberou v závislosti na

použitém hostiteli. Pro tento účel se DNA kódující nitrilázu vloží do vektorů autonomně se replikujících uvnitř vybrané hostitelské buňky nebo do integrativních vektorů vybraného hostitele. Takové vektory je možné připravit metodami, které jsou odborníkovi obecně známé a výsledné konstrukty se vloží do vhodného hostitele standardními metodami jako je např. elektroporace.

Jako hostitelské mikroorganismy je třeba zmínit zejména *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas putida*, *E. coli*, nebo mikroorganismy rodu *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Streptomyces* a *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Penicillium* a *Aspergillus*.

Výhodným vektorem pro expresi v *E. coli* je plazmid pRPA-BCAT6.

Druhý krok způsobu podle předkládaného vynálezu spočívá v imobilizaci biologického materiálu. tato imobilizace se výhodně provede v přítomnosti pevné matrice, a umožní získat pevné částice, jejichž velikost, tvar a mechanický odpor je možné kontrolovat. Do dává současné použití polyazetidínového polymeru nebo jiných zesíťovacích činidel.

Imobilizace se může týkat buďto celých buněk nebo buněk, které byly permeabilizovány. Také se může týkat enzymového roztoku zcela bez buněk. Enzymy použité pro imobilizaci jsou nitrilázy.

Způsob imobilizace spočívá v imobilizaci aktivního biologického materiálu v pevné matici, zejména s částicemi velikosti od 1 μm do 500 μm , výhodně velikosti od 10 μm do 200 μm , a sice působením chemického činidla, které reaguje s aminovými (NH_2 , NH), karboxylovými (COOH), hydroxylovými (OH), thiolovými (SH) nebo amidovými (CONH_2) skupinami biologického materiálu a nosiče (matrice). Taková chemická činidla také činí biologický materiál a materiál nosiče nerozpustným (insolubilizují) ve vodě. Získaná hmota je velmi

23.04.99

tvárná a umožňuje vytvářet částice požadovaného tvaru a velikosti. Soudržnost a tvrdost těchto částic je zvýšena usušením.

Biologický materiál pro imobilizaci může volitelně také obsahovat inaktivní biologický materiál přítomný v množství 0 až 200 % hmotnostních. Tímto inaktivním biologickým materiálem mohou být proteiny (albumin nebo želatina) nebo polysacharidy (chitosan, k-karagen nebo alginát).

Inertní nosič (matrice), do kterého je biologický materiál vložen, je polymerní a může být složen z hydrofóbních nebo hydrofilních, porézních nebo neporézních, organických nebo anorganických částic. Vhodný materiál částic je, aniž by tento výčet vynález nějak omezoval, např. iontoměničové pryskyřice, oxid hlinitý, syntetické oxidy křemičité, křemelina a silikagely, zeolity, dřevěné uhlí, ve vodě nerozpustné proteiny jako např. gluten a polysacharidy jako např. škrob.

Inertní materiál matrice se může přidat v množství 0,01 až 200 % hmotnostních vzhledem k množství biologického materiálu, výhodně v množství 10 až 100 %.

Chemická činidla, použitá k odstranění rozpustnosti (insolubilizaci) biologického materiálu mohou být polymery bifunkčních molekul, které reagují s aminovými (NH_2 , NH), karboxylovými (COOH), hydroxylovými (OH), thiolovými (SH) nebo amidovými (CONH_2) funkčními skupinami. K těmto polymerům patří např. polymery azetidinu, polyetyleniminu, polyamidu, a isokyanátu, alginátové gely, gely k-karagenu, aminy jako např. hexametylendiamin, aldehydy jako např. glutaraldehyd, karboxylové kyseliny jako např. kyselina adipová a isokyanáty.

Imobilizace může být provedena s využitím jednoho nebo několika těchto chemických činidel. Chemické činidlo se přidá

v takové koncentraci, že představuje 1 až 50% hmotnostních vzhledem k množství biologického materiálu a nosné matrice. Množství odpovídající 5 až 30 % je výhodné, aby se získaly dostatečně pevné částice, které si udrží vysokou aktivitu a u kterých nejsou problémy s vnitřní difúzí.

Trvání zesíťovacího ošetření je mezi 0,5 a 24 hodinami.

Teplota je při procesu imobilizace obvykle v rozmezí 4 až 65 °C, výhodná je teplota 20 až 40 °C. Teplota je při procesu imobilizace velmi závislá na stabilitě použitého biologického materiálu.

Hodnota pH je při procesu imobilizace obvykle v rozmezí 5 až 11, výhodné je pH 6 až 10, výhodnější je směrem k alkalickému pH. Volba pH je také závislá na rezistenci biologického materiálu a vhodné pH odborník snadno určí.

Vytvoření biokatalyzátoru by mělo umožnit jeho využití v libovolném systému, zejména na pevném loži.

Jedním ze způsobů přípravy může být extruze. Pro tento účel jsou biologický materiál a nosičový materiál zesíťovány přidáním jednoho nebo několika zesíťovacích činidel. Po tomto ošetření je nerozpustná hmota získána odstředěním nebo vyvločkováním (flokulací) a filtrací. Sušina ve výši alespoň 10% je výhodou. Tato hmota je potom extrudována. Z extruderu se získají tenké válečky ("vermicelli") výhodně s průměrem mezi 0,3 až 0,5 mm a délkou mezi 1 až 10 mm. Tyto válečky se pak mohou sféronizovat (upravit na kulovité částice). Poté se získané částice suší.

Dalším způsobem přípravy může být obalování rozprašováním. Při tomto způsobu se biologický materiál smíchá s jedním nebo několika chemickými činidly. Po zreagování je směs rozprašována na nosičový materiál v podobě tenké vrstvy. Tímto způsobem se získají granule s průměrnou hodnotou průměru mezi 0,1 až 0,2 mm. Volitelně se takto

získané částice mohou ponořit do roztoku redukčního činidla, např. borohydridu sodného, aby se redukovaly iminové funkční skupiny vytvořené během zesítení.

Částice získané tímto způsobem jsou dostatečně odolné k oděru, aby je bylo možno využít v pevném loži, fluidním loži nebo v míchaném reaktoru.

Třetí krok způsobu podle předkládaného vynálezu znamená použít imobilizovaný biologický materiál v koloně nebo v reaktoru. Cílem tohoto kroku je kontinuálně produkovat amonnou sůl kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomásečné z 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitrilu. Kolony nebo reaktory jsou naplněny čistým nebo naředěným roztokem 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitrilu nebo směsí obsahující 2-hydroxy-4-metyl-thiobutyronitril a amonnou sůl kyseliny 2-hydroxy-4-metyl-thiomásečné.

Kolony nebo reaktory jsou výhodně používány při teplotě mezi 10 až 60 °C a hodnotě pH mezi 5 až 9.

První systém použitý pro výrobu podle předkládaného vynálezu může sestávat ze dvou nebo více kolon navzájem spojených do série s náplní, vodného roztoku 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitrilu na vrcholu prvního sloupce a současně s doplňováním 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitrilu do ostatních kolon v množství, které je omezeno rozpustností této sloučeniny v reakční směsi. Tento systém se nazývá stupňový systém.

V systému podle druhého provedení předkládaného vynálezu se použije jedna kolona nebo několik kolon spojených navzájem paralelně do uzavřeného okruhu. V tomto systému se nepřetržitě dodává 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitril do okruhu a reakční médium se nepřetržitě dodává pomocí pumpy, takže se udržuje konstantní objem v okruhu. Tento systém se nazývá okruhový.

Typ rektoru použitý ve způsobu podle předkládaného vynálezu může být reaktor s pevným ložem, fluidním ložem nebo

s kontinuálně míchaným ložem. Výhodně jsou reaktory s pevným ložem, neboť jejich použití zmenšuje problémy s oděrem, které mohou nastat u imobilizovaných buněčných částic. Pokud se užije mikroorganismus jako takový, pak je výhodné použít míchaný reaktor spojený s ultrafiltrační jednotkou pro kontinuální separaci mikroorganismu od požadovaného produktu.

Čtvrtý stupeň, který je volitelný, spočívá v konverzi amonné soli kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomásele na příslušnou kyselinu. Tento krok je možné provést jedním ze dvou způsobů: buďto elektrodialýzou pomocí dvou- nebo tříkompartimentového elektrodialyzačního zařízení, nebo zahříváním vodného roztoku následovaným extrakcí typu kapalina/kapalina.

V závislosti na použité elektrodialyzační metodě je možné použít buďto dvou- nebo tříkompartimentové elektrodialyzační zařízení.

Termínem "kompartiment" se rozumí prostor, který je mezi dvěma membránami, tj. mezi bipolární a homopolární membránou nebo dvěma přilehlými homopolárními membránami. Termín "buňka" v souvislosti s elektrodialyzačním zařízením označuje sadu dvou nebo tří kompartimentů. Termín "zásobník" označuje útvar složený z 5 až 300 takových buněk. Elektrodialyzační zařízení (elektrodialyzér) se skládá ze zásobníku a samozřejmě z anody a katody.

Homopolární membrány, které se mohou využít ve způsobu podle předkládaného vynálezu, se dělí na dvě velké skupiny podle způsobu výroby.

Heterogenní membrány jsou vyrobeny z iontoměničových pryskyřic smíchaných s pojivem jako je např. polyvinylchlorid, polyetylén apod. Takže se mohou vytvořit pótažením např. tkaniny z polyesteru nebo polyakrylonitrilu.

Je také možné užít homogenní membrány získané zavedením funkčních skupin do inertního nosiče chemickým nebo radiochemickým roubováním. Nejčastěji užívaná chemická metoda zahrnuje zavedení funkčních skupin do latexu polymeru obsahujícího aromatické kruhy, jako je např. styren/divinylbenzen nebo styren/butadien. Takto funkcionalizovaný latex může sloužit k nanesení na tkaninu, podobně jako u heterogenních membrán. Radiochemická metoda obecně spočívá v tom, že se působením záření roubuje aromatická sloučenina, jako např. styren, na inertní nosič jako např. polyetylenový nebo polytetrafluoroetylenový list. Funkční skupiny jsou pak vneseny na aromatické kruhy stejně jako v chemické metodě.

Kationtové výměnné membrány obsahují silné kyselé skupiny, většinou sulfonátové skupiny, nebo slabé kyselé skupiny, často karboxylové skupiny. Méně často obsahují kyselé skupiny jako PO_2^{2-} , HPO_2^- , AsO_3^{2-} a SeO_3^- .

Aniontové výměnné membrány obsahují silné bazické skupiny, často kvarterní amoniové skupiny, nebo slabé bazické skupiny, často aminové skupiny. Zřídka obsahují bazické skupiny jako kvarterní fosfoniové skupiny nebo sulfoniové skupiny.

Ve způsobu podle předkládaného vynálezu kationtové membrány výhodně obsahují silné kyselé skupiny a z nich výhodně sulfonátové skupiny. Aniontové membrány výhodně obsahují silné bazické skupiny, a z nich výhodně kvarterní amoniové skupiny.

Bipolární membrány jsou souborem dvou membrán, jedné kationtové a druhé aniontové. Když je takováto membrána vystavena působení odpovídajícího elektrického pole, solvatační voda v mezimembránovém prostoru disociuje na ionty H^+ a OH^- , které migrují směrem ke katodě průchodem skrz kationtovou stranu a směrem k anodě průchodem skrz aniontovou

stranu membrány. Jako příklady takových membrán mohou být uvedeny bipolární membrány, které prodávají firmy Aqualytics, Touyama Soda nebo FuMaTech.

Anoda elektrodialyzéru je tvořena materiály obvykle užívanými pro elektrodialýzu jako je např. grafit, nikl nebo titan pokrytý vrstvou vzácných kovů nebo jejich oxidů, zejména platinou. Katoda elektrodialyzéru je také tvořena materiály obvykle užívanými pro elektrodialýzu jako je např. grafit, nerezová ocel nebo nikl.

Elektrodialyzér je naplněn vodným roztokem, který se má zpracovat. Je také nezbytné cirkulovat roztok anolytu k anodě a roztok katolytu ke katodě. Může se také užít roztok jediného elektrolytu. Ve způsobu podle předkládaného vynálezu je okruh s jediným elektrolytem zcela postačující. Úlohou elektrolytu je zajistit dostatečnou vodivost. Výhodně je tato vodivost rovna nebo větší než 20 milisiemens na 1 centimetr (mS/cm), aniž by však spodní hranice této hodnoty byla kritická pro provádění způsobu podle předkládaného vynálezu.

Použitý elektrolyt je ionizovatelná sloučenina jako např. sůl, kyselina nebo base. Elektrolytem je výhodně neelektroaktivní sloučenina. Výhodně je použití neutrálních solí jako jsou sírany, kyselin jako je kyselina sírová nebo bází jako je např. hydroxid sodný.

Použitá proudová hustota je obecně v rozmezí od 0,2 do 1,5 kA/m² a výhodně je v rozmezí od 0,4 do 1 kA/m².

Vhodná teplota pro provádění způsobu podle předkládaného vynálezu musí být v rozsahu kompatibilním se stabilitou membrán. Výhodně je způsob prováděn při teplotě v rozmezí od 30 do 60 °C.

Elektrodialyzér může pracovat různými způsoby. Může pracovat kontinuálně, tj. roztok kontinuálně protéká zásobníkem, čili několik stupňů může být umístěno v sérii,

pokud to vyžaduje úroveň zpracování, které má být dosaženo. Elektrodialyzér může také pracovat dávkově, zpracováváný roztok cirkuluje v zásobníku dokud není dosaženo požadované úrovně zpracování. A nakonec může elektrodialyzér pracovat i v přímém průtokovém režimu s částečnou recirkulací.

Podle první varianty provedení předkládaného vynálezu disociace amonné soli na kyselinu 2-hydroxy-4-metylthio-butanovou a hydroxid amonný se uskutečňuje v elektrodialyzační buňce s bipolárními membránami, která má tři kompartmenty, jak je schematicky znázorněno na obr. 1.

Elektrodialyzační zařízení vhodné k provádění způsobu podle předkládaného vynálezu se skládá z různých kompartmentů, vymezených kationtovými membránami (MC), bipolárními membránami (MB) a aniontovými membránami (MA). Tyto kompartmenty se dělí na solný kompartment (S), ze kterého se čerpá sloučenina pro separaci, bazický kompartment (B) a kyselinový kompartment (A), kde se base a kyselina regenerované ze soli koncentrují.

Soli amoniaku jsou vneseny do solného kompartmentu. Působením elektrického pole amonné ionty migrují směrem ke katodě a opouštějí kompartment S a procházejí skrz kationtovou výměnnou membránu (kationtovou membránu) a kombinují se s ionty OH^- z aniontové strany bipolární membrány, kde dochází k disociaci vody vlivem elektrického pole.

Současně karboxylátové ionty (2-hydroxy-4-metylthio-butanoát) migrují směrem k anodě, opouštějí kompartment S průchodem přes aniontovou výměnnou membránu (aniontovou membránu). Po průchodu dalším kompartmentem (A) se protonují přebytkem H^+ iontů z kationtové strany bipolární membrány. Tři sousedící kompartmenty (B), (A) a (S) tvoří elektrodialyzační buňku.

Ve druhé variantě provedení podle předkládaného vynálezu dochází k regeneraci kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiobutanové v elektrodialyzační buňce s bipolárními membránami se dvěma kompartmenty, jak jsou znázorněny na obr. 1B. Tyto dva kompartmenty jsou vymezeny kationtovými membránami a případně bipolárními membránami. Tyto kompartmenty tvoří solný/kyselinový kompartment (S/A) a bazický kompartment (B).

Amonné soli se vnesou do kompartmentu S/A. Působením elektrického pole amonné ionty migrují směrem ke katodě a opouštějí kompartment S/A a procházejí skrz kationtovou výměnnou membránu (kationtovou membránu) a kombinují se s ionty OH^- z aniontové strany bipolární membrány, kde dochází k disociaci vody vlivem elektrického pole.

Současně se kompartment S/A okyseluje (acidifikuje) v důsledku vzniku H^+ iontů z kationtové strany bipolární membrány. Dva sousedící kompartmenty (B) a (S/A) tvoří elektrodialyzační buňku.

Toto uspořádání má výhodu v nízké spotřebě energie a navíc umožňuje měnit požadovaný poměr sůl/kyselina.

Aby elektrodialyzér dobře pracoval, měla by být dostatečná elektrická vodivost bazického kompartmentu (stejně tak jako kyselinového kompartmentu v případě tříkompartmentového uspořádání) a je možné ji případně upravit podpurným elektrolytem. Tedy vodivost roztoku hydroxidu amonného se může zvýšit přidavkem amonné soli jako je např. síran amonný.

Ve výhodné variantě předkládaného vynálezu se používá 2-hydroxy-4-(metylthio)butanoát amonný.

Ve výhodném provedení podle předkládaného vynálezu se do solného kompartmentu tříkompartmentové elektrodialyzační buňky vnese směs kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomáslé a 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitrilu. Sůl se disociuje jak bylo

uvedeno výše na 2-hydroxy-4-metylthiobutyrate a migruje směrem k anodě, kde konvertuje na kyselinu 2-hydroxy-4-methylthiomáseľnou, amonné ionty migrují směrem ke katodě, kde se přeměňují na hydroxid amonný, a v solném kompartmentu zůstává voda a nepřeměněný 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitril, který je recyklován v hydrolyzační koloně.

Pomocí tepelné metody je kyselina přeměněna tím, že se posune rovnováha mezi amonnou solí a volnou kyselinou zahřátím vodného roztoku obohaceného HMTBS a odstraněním uvolňovaného hydroxidu amonného. Toho lze dosáhnout zahříváním ve vakuu nebo při atmosférickém tlaku buďto s anebo bez vytěsňování. Použití CO_2 pod tlakem je výhodné k usnadnění posunu rovnováhy. Směs HMTBS a HMTB se získá s množstvím 5 až 99,9 % HMTBA, výhodně s 10 až 50 % HMTBA vzhledem k celkovému součtu množství HMTBA a HMTBS. Viskozita těchto roztoků je mezi 1200 a $30 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ (1200 až 30 cSt) a výhodně mezi 200 a $50 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$ (200 až 50 cSt) při 25°C .

Vodné roztoky se mohou rozložit extrakcí kyseliny pomocí částečně s vodou mísitelného nebo s vodou nemísitelného rozpouštědla. Existuje velký počet rozpouštědel pro tento účel. Výhodným rozpouštědlem jsou C_5 až C_8 ketony (obsahující 5 až 8 atomů uhlíku), zvláště metylisobutylketon, étery jako např. isopropyléter, alkoholy jako např. isopropanol, estery, terciální aminy jako např. trioktylamin. Výhodná rozpouštědla ve způsobu podle předkládaného vynálezu jsou aceton, MIBK, isopropanol, isopropylacetát, isobutyléter nebo propyléter, THF nebo trioktylamin. Poměr vodné fáze k organické fázi není kritický. Avšak z hlediska účinnosti by neměl být nižší než minimální poměr 1:1 a z hlediska finanční výhodnosti by neměl přesáhnout poměr 1:3. Výhodný podle předkládaného vynálezu je poměr 1:1,5 až 1:2.

Extrakci je možné provádět kontinuálně nebo dávkově, jakýmkoliv technologickým extrakčním postupem typu kapalina/kapalina. Kaskádová nebo protiproudová míchací/dekantační zařízení, odstředivé extraktory nebo náplňové či patrové kolony jsou příklady vhodných zařízení.

Vodný roztok zbavený volné kyseliny se může znovu zpracovávat, tolikrát kolikrát je potřeba, dokud se nedosáhne úplného odstranění hydroxidu amonného, pokud je to žádoucí.

Organická fáze se zpracovává tak, aby se izolovala HMTBS. To se provádí výhodně odpařením rozpouštědla nebo extrakcí horkou vodou. Aby se zabránilo případnému poškození HMTBA, ošetření horkou vodou se může za pomoci vakua udržet tak nízko jak je to jen možné.

V obou těchto způsobech disociace amonné soli vzniká vodný roztok hydroxidu amonného. Ten se může zpracovat tak, aby se hydroxid amonný koncentroval. Destilace a koncentrace hydroxidu amonného v jednom nebo několika stupních s tlakem nebo bez tlaku je výhodná. Předběžný vytěšňovací stupeň by mohl být výhodný. Koncentrovaný roztok hydroxidu amonného se může vracet pro syntézu kyseliny kaynovodíkové, která je součástí syntézy 2-hydroxy-4-methylthiobutyronitrilu.

V pátém stupni se koncentruje vodný roztok HMTBS a/nebo volné kyseliny. To se výhodně provádí odpařením vody.

Předmětem vynálezu je také výrobní zařízení pro provádění způsobu podle předkládaného vynálezu. Takové zařízení je schematicky znázorněno na obr. 2 a skládá se z přívodů 1 a 2, určených pro vnášení MTPA kyanhydrinu a vody do reaktoru 3. Reaktor 3 má fixní lože s recirkulací, které je naplněno imobilizovanými enzymy nebo bakteriálními kmeny. Část roztoku se odvádí z reaktoru 3 do koncového reaktoru 4. Ukončovací reaktor 4 je opět typ s pevným ložem s imobilizovanými enzymy nebo bakteriálními kmeny.

Koncentrovaný roztok HMTBS se získává na výstupu z reaktoru 4 prostřednictvím výtoku 5.

Koncentrovaný roztok HMTBS je možné dále zpracovat dvěma zcela odlišnými způsoby v závislosti na požadovaném konečném produktu.

Pokud je požadavkem získat produkt obsahující vysoký podíl HMTBS, pak je produkt z výtoku 5 veden do odpařovače 6, který umožňuje koncentrovat produkt a pak je na výtoku 8 získán koncentrovaný roztok obsahující zejména HMTBS a malé množství volné kyseliny. Přebytná voda a také frakce hydroxidu amonného jsou odváděny výtokem 7.

Pokud se požaduje získat produkt obsahující vysoký podíl volné kyseliny, koncentrovaný roztok HMTBS z výtoku 5 je veden do bipolárního dialyzačního systému 9. V tomto systému je do větší či menší míry hydroxid amonný oddělen od kyseliny elektrodialýzou. Směs zbavená amoniaku se pak získá na výtoku 11 a pak se koncentruje odpařovačem 12, aby se získal koncentrovaný roztok obsahující především volnou kyselinu a jen velmi málo nebo vůbec žádnou HMTBS. Roztok obohacený hydroxidem amonným se odvádí výtokem 10. Hydroxid amonný se pak získá vytěsněním v 15. Vytékající hydroxid amonný se může koncentrovat destilací v 16, voda se pak získává v 18. Koncentrovaný roztok hydroxidu amonného se pak může vracet pro syntézu HCN.

Následující příklady předkládaného vynálezu slouží k ilustraci vynálezu aniž by ho jakkoliv omezovaly.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Purifikace a sekvencování N-konce nitrilázy

Nitriláza byla purifikována ve čtyřech stupních. Souhrnný přehled purifikace je uveden v tabulce 1.

Buňky *Alcaligenes faecalis* byly kultivovány 24 hodin ve 30 °C v minimálním médiu v přítomnosti benzonitrilu (0,5 g/l). Po odstředění kultury byl pelet přenesen do pufru TG (25mM Tris-HCl, 10 % (hmot./objem) glycerol, pH 7,5) a buněčná suspenze byla ošetřena ultrazvukem, aby se získal hrubý extrakt. Hrubý extrakt byl pak ošetřen síranem amonným až do 30 % saturace. Získaná sraženina se resuspendovala v pufru TG a pak dialyzovala proti 2 litrům stejného pufru přes noc. Získaný roztok se pak nanášel iontoměničovou kolonu Q SAepharose Fast Flow HR 26/10 předem ekvilibrovanou TG pufrem. Nitriláza pak byla eluována pomocí gradientu NaCl od 0 do 1 M. Frakce obsahující aktivitu byly smíchány a koncentrace síranu amonného byla upravena na 1 M. Roztok byl pak nanášen na hydrofobní interakční kolonu fenylsefarozy HR5/5 předem ekvilibrovanou TG pufrem s přidavkem 1M (NH₄)₂SO₄. Aktivita byla eluována gradientem síranu amonného od 1 M do 0 M.

Molekulová hmotnost proteinu byla zjišťována gelovou filtrací a byla určena na asi 260 kDa. Na gelu SDS-PAGE byl pozorován jediný pás velikosti 43 kDa (95% čistota). Jedná se tedy pravděpodobně o protein se strukturou α_6 , kde hmotnost α je 43 kDa.

Tabulka 1

Souhrnný přehled purifikace nitrilázy

Frakce	Celkový protein (mg)	Celková aktivita ($\mu\text{mol/h}$)	Specifická aktivita ($\mu\text{mol/h.mg}$)	Výtěžek proteinu (%)	Purifik. faktor
Celé buňky	955	4300	4,5	100	1
hrubý extrakt		2400			
síran amonný		650			
QHSL 26/10	3	360	120	0,3	27
MonoQ HR 5/5	1,5	240	160	0,15	35
Fenylsefaróza	1	120	110	0,1	24

Podmínky: Koncentrace nitrilu 50 mM, fosfátový pufr 100mM pH 7,0, 30 °C.

Příklad 2

Klonování nitrilázy z *Alcaligenes faecalis* ATCC8750

Sekvence NH₂-konce nitrilázy z příkladu 1 vykazuje úplnou identitu se sekvencí N-konce nitrilázy z *Alcaligenes faecalis* JM3 (Kobayashi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 247-251, 1993), přičemž N-konce bakteriálních nitriláz vykazují 35 až 57% identitu ve 14 zbytcích. Původce se proto domnívá, že nitriláza podle předkládaného vynálezu purifikovaná z kmene ATCC 8750 je podobná té, kterou popsali Kobayashi et al.

Klonovací strategie zahrnovala amplifikaci genu pro tuto nitrilázu pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) na genomové DNA kmene ATCC8750 pomocí dvou oligonukleotidových primerů odvozených na základě sekvence, kterou publikovali Kobayashi et al.

Oligonukleotidové primery byly syntetizovány tak, že jeden hybridizoval s 5'-koncem a druhý s 3'-koncem sekvence, kterou publikovali Kobayashi et al.

5' (PCRAF1): CCGGGATTCATATGCAGACAAGAAAAATCGTCC (Sek id. č. 1)

3' (PCRAF2): TCCTTCTGCGTCCCGATCCCGCAT (Sekvence id. č. 2)

Primer PCRAF1 obsahuje 12 nukleotidů na 5'-konci, které umožnily vnesení restrikčního místa pro enzymy EcoRI a NdeI proti směru (normální transkripce) od počátečního kodonu ATG. Primer PCRAF2 umožnil vnesení restrikčního místa pro enzym BamHI. Genomová DNA *Alcaligenes faecalis* kmene ATCC8750 byla extrahována postupem s použitím CTAB, který publikoval Asubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Willey & Sons, Inc., 2.4.1 - 2.4.5). 100 ng DNA bylo použito pro PCR. Aby se měnila specifita reakce, byly testovány různé koncentrace $MgCl_2$ dle Asubela et al. v celkovém objemu reakce 100 μ l a s 2,5 jednotkami Taq DNA polymerázy (Perkin Elmer). Dvě další reakce PCR byly provedeny s 1,5 mM $MgCl_2$ a 5% DMSO nebo 5% formamidem. Termocykler Perkin Elmer 9600 byl naprogramován pro následující posloupnost: 5 minut 95 °C, pak 30 cyklů (30 sekund 95 °C, 30 sekund 55 °C, 45 sekund 72 °C) a nakonec 4 minuty 72 °C. Produkty amplifikace byly analyzovány elektroforézou na 0,8% agarózovém gelu. Hlavní pás, jehož velikost odpovídala očekávané velikosti 1,15 kb, byl amplifikován ve všech reakcích, ale s největší specifitou v reakci s 1,5 mM $MgCl_2$ a 5% DMSO. Reakční produkt získaný v těchto podmínkách byl ponechán pro další kroky. Vzorek bylo ošetřeno proteinázou K, extrahován fenolem/chloroformem a pak precipitován etanolem. Pelet byl resuspendován a inkubován 2 hodiny ve 37 °C se 40 jednotkami enzymu EcoRI a 40 jednotkami enzymu BamHI. Po rozdělení

elektroforézou na 0,7% agarózovém gelu byl vyříznut pás velikosti 1,15 kb a extrahován. Takže DNA mohla být klonována do vektoru pBSK (Stratagene, La Jolla, USA) otevřeného pomocí EcoRI-BamHI obvyklým způsobem. 5 nezávislých klonů nazvaných pRPA-BCAT 1 až 5 bylo pak analyzováno enzymatickým štěpením plazmidu enzymy NdeI, EcoRI, BamHI, BspMI a BglII (viz obr. 3). Získaný vzorec odpovídal teoretickému restrikcímu vzorci plazmidu získaného stejným způsobem se sekvencí, kterou publikovali Kobayashi et al. Kmen XL1Blue(pRPA-BCAT3) byl uložen v Holandské sbírce mikroorganismů Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) pod číslem CBS 998-96.

Příklad 3

Sekvencování fragmentu 1130 bp obsahujícího DNA kódující polypeptid s nitrilázovou aktivitou

Inzert klonovaný do plazmidu pRPA-BCAT3 byl sekvencován firmou Genome Expres S.A. (Grenoble, Francie) z DNA připravené v laboratoři minipreparací (pomocí soupravy Wizard mini-prep, Promega). Strategie sekvencování tohoto fragmentu, provedeného obvyklým způsobem odborníkovi známým, je znázorněna na obr. 4. Deset vnitřních oligonukleotidových primerů (označených čísly 623 až 629 a 681 až 682 na obr. 4) bylo syntetizováno na základě sekvence nitrilázy z *Alcaligenes faecalis* JM3 (Kobayashi et al.). Tato sada primerů byla doplněna univerzálními primery "reverse" a "M12 forward". Každý úsek byl sekvencován nejméně jednou na každém řetězci DNA.

Získaná DNA sekvence vykazuje dvě odlišnosti ve srovnání s publikovanou sekvencí: jedna odlišnost je ve struktuře, která je předpokládaným terminátorem transkripce, a druhá je v nitrilázovém genu, zvaném nitB, a sice

substituce $\text{Asn}^{279} \rightarrow \text{Asp}$. tyto dva úseky byly znovu sekvencovány v laboratoři na plazmidech pRPA-BCAT1, 2, 4 a 5 se dvěma specifickými primery 710 a 682 (viz obr. 4). Záměna $\text{C} \rightarrow \text{T}$ v pozici 1412 (ve smyslu číslování genu jak ho publikovali Kobayashi et al.) v úseku terminátoru byla nalezena ve všech klonech. Je to tedy mutace, která odlišuje dva kmeny *Alcaligenes faecalis*. Záměna $\text{A} \rightarrow \text{G}$ v pozici 1138 je přítomna pouze v plazmidu pRPA-BCAT3. Jde tedy o mutaci vnesenou Taq DNA polymerázou v průběhu PCR.

Příklad 4

Expres nitrilázy v *E. coli* BL21 (DE3)

Pro potvrzení identifikace klonované sekvence DNA s nitrilázovým genem, byl gen *nitB* umístěn pod kontrolu genového promotoru $\Phi 10$ fága T7 (PT7) následujícím postupem. Inzerty NdeI-BamHI velikosti 1,13 kb z plazmidů pRPA-BCAT3 a pRPA-BCAT4 byly klonovány do vektoru pXL2432, čímž vznikly vektory pRPA-BCAT12 a pRPA-BCAT13 znázorněné na obr. 5. Rodičovský vektor pXL2432 je hybrid úseku plazmidu pET9 (Studier et al., Methods in Enzymol. 185: 60-89, 1990) mezi místy AccI a EcoRI, který obsahuje replikační počátek (ORI) a selektovatelný marker kódující rezistenci ke kanamycinu (Kan), a úseku mezi místy EcoRI a AccI plazmidu pET11a (Novagen Inc., Madison, WI, USA), který obsahuje expresní kazetu, represerový gen *lacI* a gen regulující počet kopií ROP.

Kultivace bakterií byla prováděna v indukčních podmínkách. Kmen (Novagen Inc., Madison, WI, USA) obsahující plazmid pRPA-BCAT12, kmen BL21(DE3) obsahující plazmid pRPA-BCAT13 a také kmen BL21(DE3) obsahující plazmid pXL2432 byly kultivovány 16 hodin v médiu LB při 37 °C (Miller, 1972,

Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) obsahujícím 50 µg/ml kanamycinu a pak bylo inokulováno stejné médium 1/100 objemu při stejné teplotě. Když kultury dosáhly OD_{600} mezi 0,5 a 1, byl přidán IPTG ve výsledné 1mM koncentraci. Po další 6hodinové kultivaci byly bakterie odebrány. Stejný postup byl aplikován při kultivaci kmenu BL21(DE3) obsahujícího plazmidy pRPA-BCAT12 a pXL2231, kmenu BL21(DE3) obsahujícího plazmidy pRPA-BCAT13 a pXL2231 a také kmenu BL21(DE3) obsahujícího plazmidy pXL2432 a pXL2231 s tím, že byl do kultivačního média přidán tetracyklin v množství 12 µg/ml. Plazmid pXL2231, který je odvozený z vektoru pXL1635 (viz patentová přihláška FR 90/05185 z 24. 04. 1990) patří do inkompatibilní skupiny IncP a je proto kompatibilní s plazmidy pRPA-BCAT12 a pRPA-BCAT13, která mají replikační počátek plazmidu ColE1. Jeho selektovatelným markerem je rezistence k tetracyklinu a nese fragment EcoRI-HindIII velikosti 2,2 kb obsahující geny GroES a GroEL kódující molekulární chaperony *E. coli* (Fayet et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, : 435-445). Expresse nitrilázy byly analyzována na 10 % SDA-PA gelu v hrubé frakci po sonikaci buněk, anebo po odstředění v peletu a supernatantu. Výsledky jsou znázorněny na obr. 6 a ukazují úroveň exprese nitrilázy (nitB) v extraktech buněk, ve kterých alespoň jeden plazmid obsahuje inzert s nitB, avšak protein je v podstatě v nerozpustné formě ačkoliv přítomnost plazmidu pXL2231 umožňuje zvýšit rozpustnou frakci nitrilázy.

Obr. 6 znázorňuje ukazuje výsledek na gelu, kde M představuje molekulový marker s velikostmi uvedenými v kDa a jednotlivé dráhy jsou:

- A, D a G představují hrubé frakce BL21(DE3) +pRPA-BCAT12 , BL21(DE3) + pRPA-BCAT13 a BL21(DE3) + XL2432,

- B, E a H představují supernatanty získané ze stejných kmenů,
- C, F a I představují pelety získané ze stejných kmenů,
- J, N a Q jsou hrubé frakce získané z BL21(DE3) + pXL2231 + pRPA-BCAT12, BL21(DE3) + pXL2231 + pRPA-BCAT13 a BL21(DE3) + pXL2231 + XL2432,
- K, O a R jsou supernatanty získané ze stejných kmenů a
- L, P a S jsou pelety získané ze stejných kmenů.

Kmen BL21(DE3)/pRPA-BCAT12 + pXL2231 byl nazván RPA-BIOCAT126, kmen BL21(DE3)/pRPA-BCAT13 + pXL2231 byl nazván RPA-BIOCAT127. Aktivita nitrilázy v kulturách RPA-BIOCAT126 RPA-BIOCAT127 a v kultuře RPA-BIOCAT66, která odpovídala BL21(DE3)/pXL2432, byla stanovena následujícím způsobem. Bakterie byly kultivovány stejně, jak bylo popsáno v předchozím textu, až na to, že byl změněn celkový objem kultury (50 ml) a výsledná koncentrace IPTG (0,1 mM). Kultury byly odstředěny a pak pelét nasát do 10 ml 100mM kaliumfosfátového pufru pH 7,0. Hydrolýza HMTBN byla provedena s 500 μ l této suspenze, která se přidala k 500 μ l 200mM roztoku HMTBN pH 7,0. Kinetika hydrolýzy byly získána smícháním 100 μ l této směsi s 900 μ l 0,1N kyseliny fosforečné v pravidelných intervalech od 1 do 4 hodin. Množství vzniklé HMTBA bylo analyzováno pomocí HPLC jak je popsáno v patentové přihlášce USA č. 98/809 184. Výsledky jsou uvedeny v tab. 2.

Tab. 2.

Aktivity kmenů RPA-BIOCAT66, RPA-BIOCAT126 a RPA-BIOCAT127

RPA-BIOCAT	Médium	Indukce	Doba kultivace	OD ₆₆₀	Aktivita (U)
66	LB Km	0,1 mM IPTG	24 hodin	2,5	0
126	LB Km Tc	0,1 mM IPTG	24 hodin	2,4	15
127	LB Km Tc	0,1 mM IPTG	24 hodin	1,9	10

Zkratky: Km: kanamycin 50 µg/ml, Tc: tetracyklin 12 µg/ml,
U: kg HMTBA vytvořené za 1 hodinu na 1 kg suché hmotnosti

Pro zvýšení rozpustnosti exprimovaného polypeptidu nitrilázy byl zkonstruován plazmid pRPA-BCAT37. Nejdříve byl připraven plazmid pXL2391 ligací fragmentu EcoRI-PvuII velikosti 5,9 kb z plazmidu pDSK519 (Keen et al., 1988, Gene 70: 191-197) ošetřeného polymerázou Klenowa s fragmentem HindIII velikosti 2056 bp z plazmidu pHP45ΩSp (Prentki. a Krisch, 1984, Gene 29: 303-313) ošetřeného nukleázou z fazolu (*Phaseolus Aureus*). Plazmid pXL2391 byl pak štěpen enzymy SmaI a SacI a byl do něho vložen inzert velikosti 2,3 kb nesoucí operon GroESL z plazmidu pXL2231 naštěpeného HindIII a oštěpeného Klenowem a pak štěpeného SacI. Plazmid pRPA-BCAT37 je tedy derivátem plazmidu RSF1010 s vyšším číslem počtu kopií než plazmid pXL2231 a kompatibilní s plazmidy nesoucími počátek *colE1* a rezistenci ke streptomycinu jako marker. tento plazmid byl vložen do kmenu BL21(DE3)/pRPA-BCAT12, čímž vznikl kmen RPA-BIOCAT171. Aktivita, uvedená v tab. 3, byla měřena na kultuře obdobné tomu, co již bylo popsáno s tím rozdílem, že tetracyklin byl nahrazen streptomycinem v koncentraci 100 µg/ml.

Tab. 3

Aktivita kmenu RPA-BIOCAT171

RPA-BIOCAT	Médium	Indukce	Doba kultivace	OD ₆₆₀	Aktivita (U)
171	LB Km Sm	0,1 mM IPTG	24 hodin	3,2	14

Zkratky: Km: kanamycin 50 µg/ml, Sm: streptomycin 100 µg/ml,
U: kg HMTBA vytvořené za 1 hodinu na 1 kg suché hmotnosti

Příklad 5

Expresa nitrilázy v buňkách *E. coli* DH5α

Pro tento účel byl zkonstruován plazmid pRPA-BCAT6 klonováním fragmentu ScaI-NdeI velikosti 0,6 kb z pXL2158 obsahujícího promotor *P_{trp}* a vazebné místo pro ribozom RBS_{CI} (Levy-Schill et al., 1995, Gene 161: 15-20) do plazmidu pBCAT3 (viz obr. 3). Expresa bylo dosaženo v bakteriích kmene DH5α obsahujících plazmid pRPA-BCAT6 a/nebo plazmid pXL2035 (Levy-Schill et al.) následujícím postupem. Prekultura byla inkubována 16 hodin ve 37 °C v médiu M9 s glukózou ((Miller, 1972, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) obsahujícím 0,4% kaseinových aminokyselin, 100 µg/ml tryptofanu a 100 µg/ml karbenicilinu. Pro kmeny obsahující pXL2035 byl přidán kanamycin v množství 50 ng/l. Expresa se začala projevovat po naředění satureované kultury 1/100 stejným médiem ale bez tryptofanu při inkubaci 8 až 16 hodin ve 37 °C.

Analýza SDS-PAGE extraktů z různých kmenů byla provedena stejně jak bylo popsáno v předchozím příkladu a je znázorněno na obr. 7.

Na obr. 7 M představuje molekulový marker s velikostmi uvedenými v kDa a jednotlivé dráhy jsou:

- L, I, F a C představují hrubé frakce DH5 α +pRPA-BCAT/3,/6,/6 + pXL2035, RPA-BIOCAT76,
- K, H E, a B představují supernatanty získané ze stejných kmenů a
- J, G, D a A představují pelety získané ze stejných kmenů.

Plazmid pRPA-BCAT6 umožnil získat malé množství převážně nerozpustného polypeptidu velikosti 43 kDa. Koexprese GroE z plazmidu pXL2035 snížila expresi, ale po třech následných subkulturách kmenu DH5 α (pRPA-BCAT6+pXL2035) se vybraný kmen RPA-BIOCAT76 vrátil k původní hodnotě exprese polypeptidu nitrilázy, který byl prakticky zcela rozpustný. Testy aktivity byly provedeny stejným způsobem jaký byl již popsán v předchozím příkladu a jejich výsledky jsou uvedeny v tab. 4.

Tab. 4.

Aktivita kmenů DH5 α (pRPA-BCAT3), DH5 α (pRPA-BCAT6), DH5 α (pRPA-BCAT6+ pXL2035) a RPA-BIOCAT76

Kmen	Médium	Doba kultivace	OD ₆₆₀	Aktivita (U)
DH5 α (pRPA-BCAT3)	M9 Cb	24 hodin	4	0
DH5 α (pRPA-BCAT6)	M9 Cb	24 hodin	4	0,6
DH5 α (pRPA-BCAT6+ pXL2035)	M9 Cb Km	24 hodin	3	1,6
RPA-BIOCAT76	M9 Cb Km	24 hodin	3,8	5

Zkratky: Km: kanamycin 50 µg/ml, Cb: karbenycilin 100 µg/ml,
U: kg HMTBA vytvořené za 1 hodinu na 1 kg suché hmotnosti

Tato data ukazují, že koexprese GroE umožňuje zvýšit expresi nitrilázy a že konvenční selekce kmenů v následných subkulturách také přispívá ke zvýšení aktivity rekombinant.

Příklad 6

Expres nitrilázy v *Pseudomonas putida* a *Alcaligenes faecalis*.

Expresní systém popsany v příkladu 5 byl použit pro přípravu nitrilázy v *Pseudomonas putida* a *Alcaligenes faecalis*. Fragment NdeI-XbaI velikosti 1,14 kb z pRPA-BCAT6 obsahující gen *nitB* byl vložen do míst NdeI-XbaI vektoru pXL1289. vektor pXL1289 je derivát pKT230 (Bagdasarian et al., 1981, gene 15: 237-247) nesoucí multihostitelský replikační počátek (*oriV*) pro Gram-negativní bakterie a obsahující fragment EcoRI-NdeI velikosti 120 bp nesoucí *P_{trp}* promotor a RBS_{CII} z pXL534 (Latta et al., 1990, DNA And Cell Biol.9: 129-137) a inzert NdeI-XbaI kódující gen *cobA* (Crouzet et al. 1990, J. Bacteriol. 172, 5968-5979) a inzert XbaI-bamHI obsahující terminátor *T_{trmB}* z pXL534 (Latta et al., 1990, DNA And Cell Biol.9: 129-137). Získaný plazmid pRPA-BCAT14 je tedy derivátem pKT230 obsahujícím gen ~~rezistence ke kanamycinu (Kan) a gen nitB pod kontrolou~~ *P_{trp}*:RBS_{CII} (viz. obr. 8).

V průběhu vnášení plazmidu do *E. coli* kmene DH5α byl selektován specifický klon, který exprimuje nitrilázu, jejíž molekulová hmotnost na SDS-PA gelu byla 44 kDa místo 43 kDa. Plazmid nesený tímto klonem přitom vykazuje stejný restriční vzorec jako plazmid pRPA-BCAT14 a byl proto nazván pRPA-BCAT24. Nakonec byl zkonstruován ještě plazmid pRPA-BCAT23

stejným způsobem jako plazmid pRPA-BCAT14 až na následující modifikace: Fragment StuI-BsmI velikosti 136 bp z pRPA-BCAT6 byl nahrazen fragmentem StuI-BsmI z pRPA-BCAT4. Plazmid pRPA-BCAT23 proto exprimuje nitrilázu nitB se zbytkem Asn v pozici 279.

Plazmidy pRPA-BCAT14, 23 a 24 byly vneseny elektroporací do *Pseudomonas putida* kmene G2081. Kmen G2081 je odvozen od kmene KT2440 (Bagdasarian a Timmis 1981, v Hofschneid a Goebel, Topics in Microbiology and Immunology, 47, Springer Verlag, Berlin) selekcí na spontánní rezistenci ke kyselině nalidixové a rifampycinu. Vektor pKT230 byl užit jako kontrolní plazmid.

Plazmidy pRPA-BCAT14, pRPA-BCAT23, pRPA-BCAT24 a pKT230 pak byla extrahovány z kmenů *Pseudomonas putida*, aby mohly být znovu vneseny do kmene ATCC8750 *Alcaligenes faecalis* (= RPA-BIOCAT1). Kměny G2081(pRPA-BCAT14), G2081(pRPA-BCAT23), G2081(pRPA-BCAT24) a G2081 (pKT230) byly společně s kmeny RPA-BIOCAT1(pRPA-BCAT14), RPA-BIOCAT1(pRPA-BCAT23), G2081(pRPA-BCAT24) a G2081(pKT230) kultivovány přes noc při 30 °C v LB médiu obsahujícím 50 mg/l kanamycinu. Prekultury byly naředěny 1/100 do nového média M9 obsahujícího 50 mg/l kanamycinu a inkubovány 20 hodin při 30°C.

Expres nitrilázy byla hodnocena na SDS-PA gelu v hrubé frakci po sonikaci buněk, v peletu po odstředění a v supernatantu. Výsledky jsou uvedeny na obr. 9. V případě kmenů RPA-BIOCAT1(pKT230) a G2081(pKT230) byl nanesen na gel pouze hrubý extrakt (dráhy A a I).

Na obr. 9 M představuje molekulový marker s velikostmi uvedenými v kDa a jednotlivé dráhy jsou:

- B, D a F představují hrubé frakce RPA-BIOCAT1(pRPA-BCAT14), RPA-BIOCAT1(pRPA-BCAT23) a RPA-BIOCAT1(pRPA-BCAT24)

- C, E a G představují supernatanty získané ze stejných kmenů,
- H představuje pelet získaný z kmene RPA-BIOCATT1(pRPA-BCAT24),
- J, L a O jsou hrubé frakce získané z kmenů G2081(pRPA-BCAT14), G2081(pRPA-BCAT23) a G2081(pRPA-BCAT24),
- K, N a P jsou supernatanty získané ze stejných kmenů a
- Q je pelet získaný z kmene G2081(pRPA-BCAT24).

Tento experiment ukázal, že kmeny *Pseudomonas putida* exprimují velká množství třech rozpustných polypeptidů - nitriláz a kmen *Alcaligenes faecalis* exprimuje pouze jediný polypeptid nitrilázy, a sice o velikosti 44 kDa. Testy aktivity, provedené stejným způsobem jak bylo již popsáno v předchozím příkladu 4, ukázaly že kmeny G2081(pRPA-BCAT23), G2081(pRPA-BCAT24) a RPA-BIOCATT1(pRPA-BCAT24) projevují na HMTBN nitrilázovou aktivitu.

Příklad 7

Exprese nitrilázy v *Corynebacterium glutamicum*

Nitriláza byla exprimována v kmeni CGL1010 (= ATCC 14752) pomocí plazmidu *PcspB*, (Peyret et al., 1993, Molecular Microbiol. 9: 97-109). Fragment velikosti 530 bp obsahující promotor *PcspB* byl amplifikován z plazmidu pCGL815 (Peyret et al.) pomocí oligonukleotidových primerů KS1 a KS2.

KS1: 5'-ACGCGTTTCGACCAGATCGTCAAGTTGTGG-3' (Sekvence id. č. 4)

KS2: 5'-CATAGAGGCGAAGGCTCCTTG-3' (Sekvence id. č. 4)

Po naštěpení *SalI* byl fragment velikosti 530 bp klonován do plazmidu pBSK (Stratgene, La Jolla, USA)

otevřeného naštěpením Sali a EcoRV, čímž vznikl plázmid pCGL1084. Adaptér EcoNI/NdeI byl připraven hybridizací oligonukleotidů KS8 a KS9:

KS8: 5'-TCAACGAGCCTTCGCCTCA-3' (Sekvence id. č. 5)

KS9: 5'-TATGAGGCGAAGGCTCCTTG-3' (Sekvence id. . 6)

Nitrilázový gen byl extrahován z plazmidu pRPA-BCAT6 ve formě fragmentu NdeI-XbaI velikosti 1,1 kb. Tento fragment byl pomocí adaptéru EcoNI/NdeI vložen do pCGL1084 naštěpeného EcoNI a XbaI, čímž vznikl plázmid pCGL1086. Fragment Sali/BamHI z pCGL1086 obsahující *PcspB::nitB* byl pak klonován do plazmidu pCGL482 (Peyret et al.) do míst Sali a BamHI, což dalo vzniknout plazmidu pCGL1087. Plázmid pCGL1087 (viz obr. 10) je kyvadlový ("shuttle") vektor založený na vektoru pBI1 (Santamaria et al., 1984, J. gen. Microbiol. 130: 2237-2246, který obsahuje replikační počátek z pACYC 184 rozpoznávaný v *E. coli*, gen kódující rezistenci k chloramfenikolu (Cm) a fúzní gen *PcspB::nitB*.

Plazmidy pCGL1087 a pCGL482 byly vneseny elektroporací do buněk CGL1010 postupem který popsali Bonnamy et al., 1990 (FEMS Microbiol. Lett. 66: 263-270). Po kultivaci 20 hodin ve 37 °C v 3,7% infúzním médiu "mozek-srdce" (Difco Laboratories, Detroit, USA) s přidavkem 5 mg/l chloramfenikolu.

Testy nitrilázové aktivity byly provedeny na vzorcích z kultur stejně jako v příkladu 4. Výsledky ukázaly, že kmen CGL1010(pCGL1087) měl nitrilázovou aktivitu, zatímco kmen CGL1010/pCGL482) neměl žádnou.

Příklad 8

Expres nitrilázy v *Streptomyces lividans*

Nitriláza byla exprimována v kmenu TK24 *Streptomyces lividans* (Hopwood et al., 1985, Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, Norwich) pomocí plazmidu pIJ6021 (Takano et al., 1995, Gene 166: 133-137) a promotoru *PtipA* (Holmes et al., 1993, EMBO J. 12: 3183-3191).

Plazmid pUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985, Genom 33: 103-119) byl modifikován delecí (odstraněním) fragmentu *TfiI* velikosti 140 bp štěpením enzymem *TfiI*, ošetřením Klenowovým enzymem a opětovným uzavřením ("selfligací") vektoru. Takto získaný plazmid byla otevřen štěpením *EcoRI* a *BamHI*, aby bylo možné klonovat fragment *EcoRI*-*BamHI* velikosti 1,15 kb obsahující gen *nitB* z pRPA-BCAT3. Plazmid pOS48.4 takto získaný měl unikátní štěpné místo pro enzym *TfiI* mezi genem *nitB* a místem *BamHI*. Toto místo bylo využito pro vložení inzertu - fragmentu Ω_{hyg} velikosti 2,3 kb, získaného z plazmidu pHP45 Ω_{hyg} (Blondelet-Rouault et al., Gene, podáno k publikaci) vyštěpením *BamHI* a po ošetření Klenowem. Fragment Ω_{hyg} obsahuje gen pro hygromycinfosfotransferázu (*hyg*) ze *Streptomyces hygroscopicus* (Zalacain et al., 1986, Nucl. Acids Res. 14: 1565-1581) a uděluje *Streptomyces lividans* rezistenci k hygromycinu. Plazmid pOS48.5 takto získaný byl použit k izolaci fragmentu *NdeI*-*BamHI* velikosti 3,35 kb obsahujícího nitrilázový gen následovaný genem *hyg*, který byl klonován do plazmidu pIJ6021 (Takano et al.) otevřeného enzymy *NdeI* a *BamHI*. Jelikož se plazmid pIJ6021 replikuje pouze v buňkách *Streptomyces*, byla ligační směs transformována konvenčním způsobem (Hopwood et al.) do *Streptomyces lividans* TK24 a byly selektovány klony.

rezistentní k 200 mg/l hygromycinu (Boehringer Mannheim). Plazmidová DNA byla extrahována z těchto klonů standardním způsobem (Hopwood et al.) a po analýze se ukázalo, že jejich restriční vzorec skutečně odpovídal očekávanému konstruktu nazvanému pOS48.7 (viz obr. 11).

Dva kmeny *Streptomyces lividans* obsahující pOS48.7 a také klon obsahující plazmid pIJ6021 byly kultivovány v 50 ml média TSB (Tryptic Soy Broth, Difco) při 30°C po dobu 72 hodin se selekcí v 5mg/l kanamycinu a pak byl přidán thiostrepton v 5mg/l koncentraci a kultivace pokračovala dalších 18 hodin v podmínkách podle Hopwooda et al. Pak byla kultura sklizena byl proveden test aktivity stejně jako v příkladu 4. Výsledky ukázaly, že kmen *Streptomyces lividans* TK24 (pOS48.7) exprimoval nitrilázovou aktivitu, zatímco kmen TK24(pIJ6021) nikoliv.

Příklad 9

Hydrolyza MHTBN jinými nitrilázami

Primární sekvence nitrilázy *Comamonas testosteroni* sp., jak ji popsali Levy-Schil et al., 1995 vykazuje 31% identitu s primární sekvencí nitrilázy podle předkládaného vynálezu. Rekombinantní kmen *E. coli* TG1 (pXL2158, pXL2035), který exprimuje nitrilázu z *Comamonas testosteroni* byl kultivován v podmínkách dle Levy-Schil et al., 1995, buněčný pelet byl pak inkubován ve 100mM fosfátovém pufru pH 7,0 s 50mM HMTBN při 30 °C. Změřená aktivita byla 2,3 kg/h.kg CS. Podobně jako nitriláza podle předkládaného vynálezu je nitriláza z *Comamonas testosteroni* schopna hydrolyzovat HMTBN.

Dále údaje uvedené v příkladu 4 s plazmidy pRPA-BCAT12 a pRPA-BCAT13 ukazují, že substituce Asn279 → Asp279

23.04.99

v nitriláze z *Alcaligenes faecalis* umožňuje konzervovat aktivitu na HMTBN.

Příklad 10

Přidávání nosiče

5 g suchých buněk bylo přidáno do 20 g vody s hodnotou pH nastavenou na 7,0. Potřebné množství (viz tabulka) nosiče (CELITE 545, Prolabo, Francie) bylo přidáno a dokonalé homogenizaci byla suspenze zesítna přidavkem 15 % glutaraldehydu (vzhledem k celkové suché hmotnosti) a pak 10 % polyetyleniminu (SEDIPUR, BASF, Německo). Suspenze se míchala 1 hodinu při teplotě místnosti. Suspenze pak byla vyvločkována přidavkem 0,001% aniontového flokulačního činidla Superfloc A100. Zesítná hmota pak byla izolována filtrací.

Takto získaná hmota byla znovu zesítna přidavkem 10 % polyazetidinu (KYMENE 557, Hercules, USA) vzhledem k celkové suché hmotnosti. Hmota, ještě za vlhka, byla extrudována skrz hubici s průměrem 0,5 mm a usušena.

Aktivita částic získaných extruzí byla stanovena způsobem popsaným v patentové přihlášce USA č. 08/809 184, na kterou se tímto odkazujeme.

Nosič (g)	Aktivita (%)
0 g	100
2,5 g	215
5 g	250

Přídavek nosiče k buňkám podstatně zvýšil jejich aktivitu. Pokus byl opakován s tím, že CELITE byl nahrazen

pšeničným glutenem (Roquette, Francie) částečně rozpustným ve vodě nebo želatinou (SBI, Francie) úplně rozpustnou ve vodě.

Nosič (g)	Aktivita (%)
0 g	100
5 g glutenu	160
5 g želatiny	nestanoveno*

* Nebylo stanoveno, protože buněčná suspenze nevločkovala a nebylo možné ji zachytit filtrací

Tento příklad ukázal, že CELITE může být nahrazen glutenem. V případě, že se použila želatina (zcela rozpustná), vytvoření katalyzátoru výše popsaným způsobem (extruzí) je nemožné.

Příklad 11

10 g *E. coli* BIOCAT171 z příkladu 4 připravených aerobní kultivací v LB médiu bylo smícháno s 10 g CLARCEL78 (CECA, Francie) v 500 g 100mM fosfátového pufru pH 7,0. Po homogenizaci se přidalo 6 g 25% glutaraldehydu a suspenze se míchal 15 minut při teplotě místnosti. Pak se přidaly 2 g polyetyleniminu a ještě 6 g 25% glutaraldehydu. Celá směs se míchala 1 hodinu při teplotě místnosti. Směs se pak vyvločkovala přidavkem 5 ml roztoku SUPERFLOC A100 na 0,2% (CYTEC, Francie). Vzniklá hmota se izolovala filtrací a do získané pasty se přimíchalo 16 g 12,5 % polyazetidinu (KYMENE 557, Hercules, USA) a pak byla extrudována hubicí s průměrem 0,5 mm. Takto získané tenké válečky "nudličky" ("vermicelli") se usušily při 35 °C v sušárně a pak byly ponořeny na

23.04.99

30 minut do lázně 1% NaBH_2 v 50mM borátovém pufru pH 10,0. Biokatalyzátor byl pak opláchnut destilovanou vodou. Biokatalyzátor byl uskladněn v 5°C nebo při teplotě místnosti v 500mM fosfátovém pufru pH 8,0.

Termostatovaná kolona s vnitřním průměrem 3 cm a výškou 45 cm byla naplněna 100 g biokatalyzátoru. Kolona byla napojena na pumpu prostřednictvím recirkulační okruhu. Celkový objem takto vzniklého reaktoru byl 430 ml. Okruh byl naplněn 25% roztokem amoniové soli kyseliny hydroxymetylthiomásečné. Roztok byl nanášen na kolonu směrem ze shora dolů průtokem 20l/hod. Voda, která probíhala pláštěm kolony a výměníkem tepla umožňovala udržovat teplotu na 35°C. Demineralizovaná voda se přidávala do okruhu rychlostí 80 g/hod a 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitril rychlostí 20 g/hod. Nadbytečný objem reakčního média se odpařoval dnem kolony, takže celkový objem v obvodu byl udržován konstantní. Takže byl získán kontinuální průtok s rychlostí konverze nitrilu 95%. Výsledná koncentrace vodného roztoku amoniové soli 2-hydroxy-4-metylthiomásečné kyseliny na výstupu z reaktoru byla 25%.

Příklad 12

Elektrodialyzér použitý v tomto příkladu obsahoval zásobník s devíti buňkami s plochou aktivního povrchu 2 dm², přičemž každá buňka byla složena ze dvou kompartmentů následujícím způsobem:

- solný/kyselinový kompartment: omezen na katodové straně kationtovou výměnnou membránou Neosepta CMB od firmy Tokuyama Soda a na anodové straně kationtovou stranou bipolární membrány Aqualytic, a

- bazický kompartment: omezený na anodové straně kationtovou membránou a na katodové straně aniontovou stranou bipolární membrány.

Anoda byla vytvořena z titanu potaženého platinou. Katoda byla z nerezové oceli.

Elektrolyt obsahující vodný roztok síranu sodného měl vodivost 100 mS/cm ve 40 °C. Rychlost cirkulace v místě elektrod byla 2 x 100 l/hod. Objem byl 5 l.

Bazický kompartment byl na počátku naplněn 5 l 1% roztoku síranu amonného.

Solný/kyselinový kompartment byl na počátku naplněn 5 l roztoku 1,44 mol/l amoniové soli kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiobutanové.

Rychlost recirkulace byla nejdříve nastavena na 130 l/hod pro solný/kyselinový kompartment a 190 l/hod pro bazický kompartment.

Elektrodialýza byla provedena dávkovým způsobem (s recirkulací) při průměrné teplotě 40 °C. Intenzita proudu byla nastavena na 9A, což poskytovalo proudovou hustotu 0,45 kA/m².

Po 155 minutách činnosti zařízení vodivost v solném/kyselém kompartmentu poklesla z 59 na 7,8 mS/cm.

Solný/kyselinový kompartment obsahoval 1,35 mol/l kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiobutanové, a to ze 100 % ve formě kyseliny.

Faradický výtěžek byl vypočten na 71 % a spotřeba energie byla 0,53 kWh na 1 kg vytvořené kyseliny.

23.04.99

Příklad 13

Elektrodialyzér použitý v tomto příkladu obsahoval zásobník s osmi buňkami uspořádanými stejně jako v příkladu 12.

Bazický kompartment byl na počátku naplněn 5,27 l 1% roztoku síranu amonného.

Solný/kyselinový kompartment byl na počátku naplněn 4,85 l roztoku 1,39 mol/l amoniové soli kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiobutanové.

Rychlost recirkulace byla nejdříve nastavena na 60 l/hod pro solný/kyselinový kompartment a 150 l/hod pro bazický kompartment.

Elektrodialýza byla provedena dávkovým způsobem (s recirkulací) při průměrné teplotě 40 °C. Intenzita proudu byla nastavena na 9A, což poskytovalo proudovou hustotu 0,45 kA/m².

Po 172 minutách činnosti zařízení vodivost v solném/kyselém kompartmentu poklesla z 59 9,5 mS/cm.

Konečný objem solného/kyselého kompartmentu byl 4,67 l.

Solný/kyselinový kompartment obsahoval 1,24 mol/l kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiobutanové a 0,148 mol/l 2-hydroxy-4-metylthiobutanoát. Konverze byla 86%. Faradický výtěžek byl vypočten na 74 % a spotřeba energie byla určena na 0,58 kWh na 1 kg vytvořené kyseliny.

Příklad 14

V tomto příkladu bylo použito obdobné zařízení jako v příkladu 13.

Bazický kompartment byl na počátku naplněn 5,46 l 1% roztoku síranu amonného.

Solný/kyselinový kompartment byl na počátku naplněn 5,23 l roztoku 1,24 mol/l amoniové soli kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiobutanové.

Rychlost recirkulace byla nejdříve nastavena na 90 l/hod pro solný/kyselinový kompartment a 150 l/hod pro bazický kompartment.

Elektrodialýza byla provedena dávkovým způsobem (s recirkulací) při průměrné teplotě 40 °C. Intenzita proudu byla nastavena na 14 A, což poskytovalo proudovou hustotu 0,7 kA/m².

Po 105 minutách činnosti zařízení vodivost v solném/kyselém kompartmentu poklesla z 57,6 na 9,8 mS/cm.

Konečné složení roztoku v solného/kyselého kompartmentu bylo následující:

1,28 mol/l kyselina 2-hydroxy-4-metylthiobutanová a 0,14 mol/l 2-hydroxy-4-metylthiobutanoát. Konverze byla 86%. Produkt byl tedy z 90% ve formě kyseliny.

Příklad 15

Bylo použito zařízení podobné zařízení použitému v příkladu 13.

Pokus byl proveden s obsahem bazického kompartmentu který byl získán jako výsledek příkladu 14.

~~Solný/kyselinový kompartment byl na počátku naplněn~~
5,2 l roztoku 1,44 mol/l amonné soli kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiobutanové.

Rychlost recirkulace byla nejdříve nastavena na 50 l/hod pro solný/kyselinový kompartment a 150 l/hod pro bazický kompartment.

Elektrodialýza byla provedena dávkovým způsobem (s recirkulací) při průměrné teplotě 42 °C. Intenzita proudu

byla nastavena na 19 A, což poskytovalo proudovou hustotu 0,95 kA/m².

Po 53 minutách činnosti zařízení vodivost v solném/kyselém kompartmentu poklesla z 59 na 27 mS/cm.

Konečný objem solného/kyselého kompartmentu byl 4,85 l.

Složení bylo následující: 0,87 mol/l kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiobutanové a 0,56 mol/l 2-hydroxy-4-metylthiobutanoátu. Míra konverze byla 56%. Finální produkt byl z 61% ve formě kyseliny. Faradický výtěžek byl vypočten na 83 % a spotřeba energie byla určena na 0,7 kWh na 1 kg vytvořené kyseliny.

Příklad 16

200,1 g HMTBS koncentrace přibližně 1,5M bylo koncentrováno dávkovým způsobem v rotační odparce. Teplota lázně byla 45 ± 5 °C. Tlak byl regulován na přibližně $2,5 \times 10^3$ Pa (25 mbar). Teplota v destilačním zařízení se měnila od 25 °C na počátku destilace až do 40 °C na jejím konci. Po třech hodinách bylo získáno 41,9 g žlutého viskózního média s následujícími charakteristikami.

Viskozita při 25 °C (mm ² s ⁻¹).	1150
%HMTBA (Br/BrO ₃)	83,3

Po nastavení titru (naředěním vodou) byl získán produkt s následujícími charakteristikami:

Viskozita při 25 °C (mm ² s ⁻¹).	396
%HMTBA (Br/BrO ₃)	79,5

23.04.99

Potenciometricky byla zjištěna následující distribuce hmoty:

% HMTBS	81,6
% HMTBA	6,0

Poměr ploch monomeru nebo dimerů/(monomer + dimery) byl stanoven pomocí HPLC:

Monomer/(monomer + dimery) 100

Dimery/(monomer + dimery) 0

Což znamená, že žádné dimery nebyly detekovány.

Příklad 17

200,0 g HMTBS koncentrace přibližně 1,5 M bylo koncentrováno dávkovým způsobem v rotační odparce. Teplota lázně byla 121 ± 5 °C. Tlak byl regulován na přibližně $9,5 \times 10^4$ Pa. Teplota v destilačním zařízení se měnila od 100 °C na počátku destilace až do 113 °C na jejím konci. Po třech hodinách bylo získáno 41,5 g žlutého viskózního média s následujícími charakteristikami.

Viskozita při 25 °C ($\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$)	-
%HMTBA (Br/BrO ₃)	90,7

Po nastavení titru (naředěním vodou) byl získán produkt s následujícími charakteristikami:

Viskozita při 25 °C ($\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$)	117
%HMTBA (Br/BrO ₃)	78,8

23.04.99

Potenciometricky byla zjištěna následující distribuce hmoty:

% HMTBS	81,6
% HMTBA	6,0

Poměr ploch monomeru nebo dimerů/(monomer + dimery) byl stanoven pomocí HPLC:

Monomer/(monomer + dimery) 95

Dimery/(monomer + dimery) 5,0

Příklad 18

40 g H₂O bylo přidáno ke 100,0 g média z příkladu 17. Médium bylo extrahováno 75,0 g isopropyléteru. Po rozdělení fází bylo po odpaření organické fáze získáno 25,6 g HMTBA s následujícími charakteristikami.

Stanovení	
Monomer/(monomer + dimery) (% plochy)	97
Dimery/(monomer + dimery) (% plochy)	3,0
Viskozita při 25 °C (mm ² s ⁻¹)	55

Příklad 19

Stárnutí roztoků popsaných v předchozích příkladech

	Příklad 16	Příklad 17	Příklad 18
Doba uchovávání ve 25 °C	40 dnů	40 dnů	100 dnů
Viskozita (mm ² s ⁻¹)	387	116	66
Monomer/(monomer+dimer)	100,0	95,0	82
Dimery/(monomer+dimer)	0,0	5,0	18

Roztoky v příkladech 16 a 17 nemění obsah dimerů po 40 dnech skladování.

23.04.99

PV 1454-99

29898

P A T E N T O V É N Á R O K Y.

1. Způsob přípravy kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomáselné (HMTBA) a/nebo amonné soli kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomáselné (HMTBS) enzymatickou hydrolýzou 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitrilu, v y z n a č u j í c í s e t í m, že

a) v prvním kroku se připraví biologický materiál, který má nitrilázovou aktivitu,

b) v druhém kroku se uvedený biologický materiál imobilizuje,

c) ve třetím kroku se 2-hydroxy-4-metylthiobutyronitril vystaví působení takto imobilizovaného biologického materiálu, aby se získala amonná sůl kyseliny 2-hydroxy-4-metylthiomáselné,

d) ve čtvrtém kroku se případně sůl získaná podle kroku c) přemění na odpovídající kyselinu a

e) v pátém kroku se produkt získaný podle kroku c) nebo d) koncentruje.

2. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nitrilázová aktivita se získá z nitrilázy *Alcaligenes*, výhodně druhu *faecalis*.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nitrilázová aktivita se získá z genetické informace kódující nitrilázu, která se exprimuje v hostitelském organismu.

4. Způsob podle nároků 1 až 3 v y z n a č u j í c í s e t í m, že hostitelský mikroorganismus je *Escherichia coli* nebo patří do rodu

Bacillus, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Penicillium* a *Aspergillus*.

5. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nitrilázová aktivita se získá z nitrilázy kódované genem klonovaným do plazmidu pRPA-BCAT3, který je uložen v CBS pod číslem CBS 998-96.
6. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 5 v y z n a č u j í c í s e t í m, že nitriláza je koexprimována s chaperonovým proteinem.
7. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m, že chaperonový protein je GroESL z *Escherichia coli*.
8. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků v y z n a č u j í c í s e t í m, že biologický materiál podle kroku a) se imobilizuje na pevný nosič.
9. Způsob podle nároku 8 v y z n a č u j í c í s e t í m, že pevný nosič má částice velikosti v rozmezí 1 μm až 500 μm , výhodně 10 μm až 200 μm , a je přidán v množství odpovídajícím 0,01 % až 200 % hmotnostních, výhodně 10 % až 100 % hmotnostních biologického materiálu.
10. Způsob podle nároku 9 v y z n a č u j í c í s e t í m, že pevný nosič se vybere ze skupiny obsahující
 - iontoměničové pryskyřice,
 - oxid hlinitý,
 - syntetické oxidy křemičité, křemelinu a silikagely,
 - zeolity,
 - dřevěné uhlí,

- ve vodě částečně rozpustné proteiny a
- polysacharidy.

11. Způsob podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, že pevný nosič je gluten.

12. Způsob podle nároku 8 v y z n a č u j í c í s e t í m, že se použije alespoň jedno chemické činidlo k zesítnění nebo zrušení rozpustnosti (insolubilizaci) biologického materiálu a nosiče.

13. Způsob podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že chemické činidlo se vybere ze skupiny obsahující

- polymery polyazetidinu,
- polymery polyetyleniminu,
- polymery polyamidu,
- polymery isokyanátu,
- alginátové gely,
- karagenové gely,
- aminy,
- aldehydy,
- karboxylové kyseliny a
- isokyanáty.

14. Způsob podle nároků 10 až 13

v y z n a č u j í c í s e t í m, že biologický materiál a nosič se smíchají za přítomnosti chemického činidla, aby se získala pasta, která se extruduje a suší.

15. Způsob podle nároků 10 až 13

v y z n a č u j í c í s e t í m, že biologický materiál

a alespoň jedno chemické činidlo se smíchají a pak nanesou na nosič v podobě tenké vrstvy.

16. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků v y z n a č u j í c í s e t í m, že směs HMTBS a HMTBA, obsahující alespoň 60 % HMTBA, výhodně alespoň 80 % HMTBA, doplněk je HMTBS, se získá elektrolytickou disociací odpovídající amonné soli, přičemž se uvolňuje hydroxid amonný.
17. Způsob podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že disociace se provádí v elektrodialyzačním zařízení s bipolárními membránami, které má tři kompartmenty.
18. Způsob podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že disociace se provádí v elektrodialyzačním zařízení s bipolárními membránami, které má dva kompartmenty.
19. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 15 v y z n a č u j í c í s e t í m, že směs HMTBS a HMTBA se získá zahříváním roztoku amonné soli.
20. Způsob podle nároků 16 až 19 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvolňovaný hydroxid amonný se destiluje, koncentruje a recykluje v syntéze HCN.
21. Vodný roztok získaný způsobem podle nároků 16 až 19, který obsahuje směs HMTBA a HMTBS, přičemž poměr hmotností $\text{HMTBA}/(\text{HMTBA} + \text{HMTBS})$ je 5 % až 99,9 %, výhodně 10 % až 50 %.

23.04.99

22. Zařízení k provádění způsobu podle nároku 1
v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje

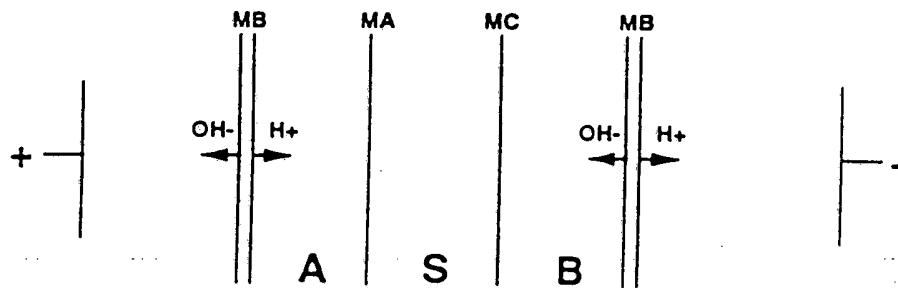
- jeden nebo několik reaktorů (3,4) naplněných
imobilizovanými enzymy s nitrilázovou aktivitou nebo
imobilizovanými hostitelskými mikroorganismy
exprimujícími enzym s nitrilázovou aktivitou,
- případně alespoň jedno elektrodialyzační zařízení (9) a
- zařízení (6, 12) koncentrující výsledný produkt.

23. Plazmid pRPA-BCAT3, který je uložen v CBS pod číslem CBS
998-96.

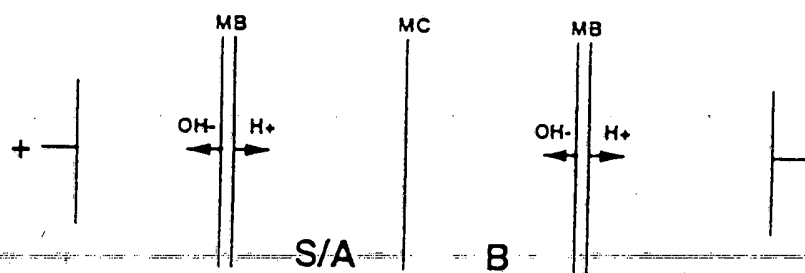
23.04.99

PV1454-99
29898

1/7



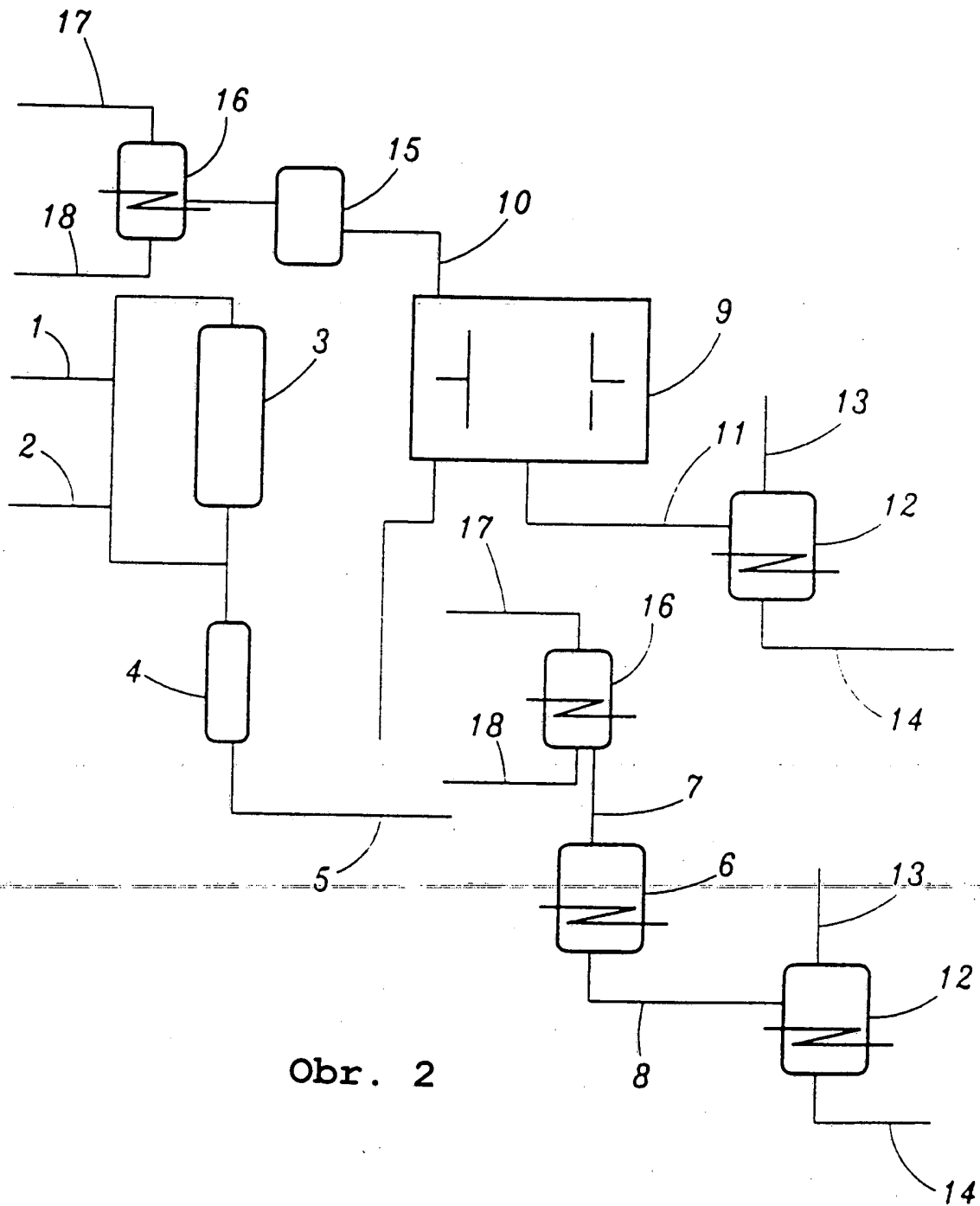
Obr. 1A



Obr. 1B

23.04.99

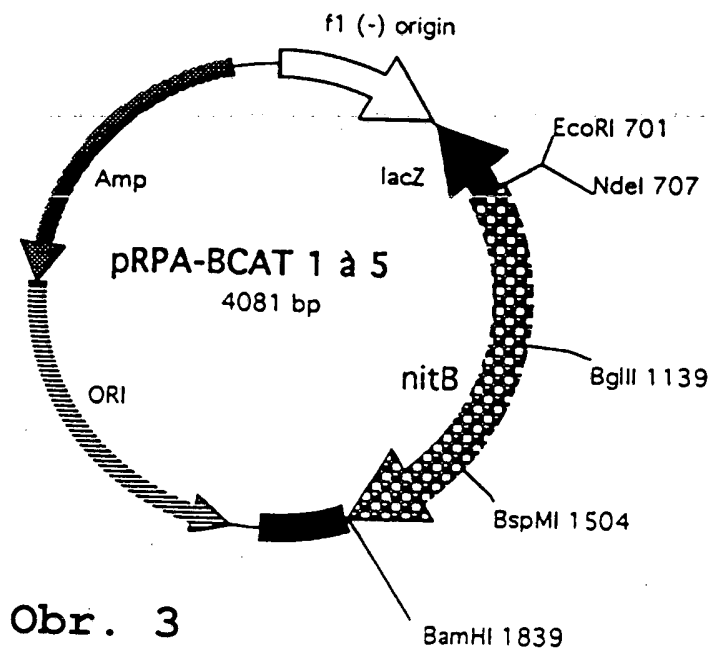
2/7



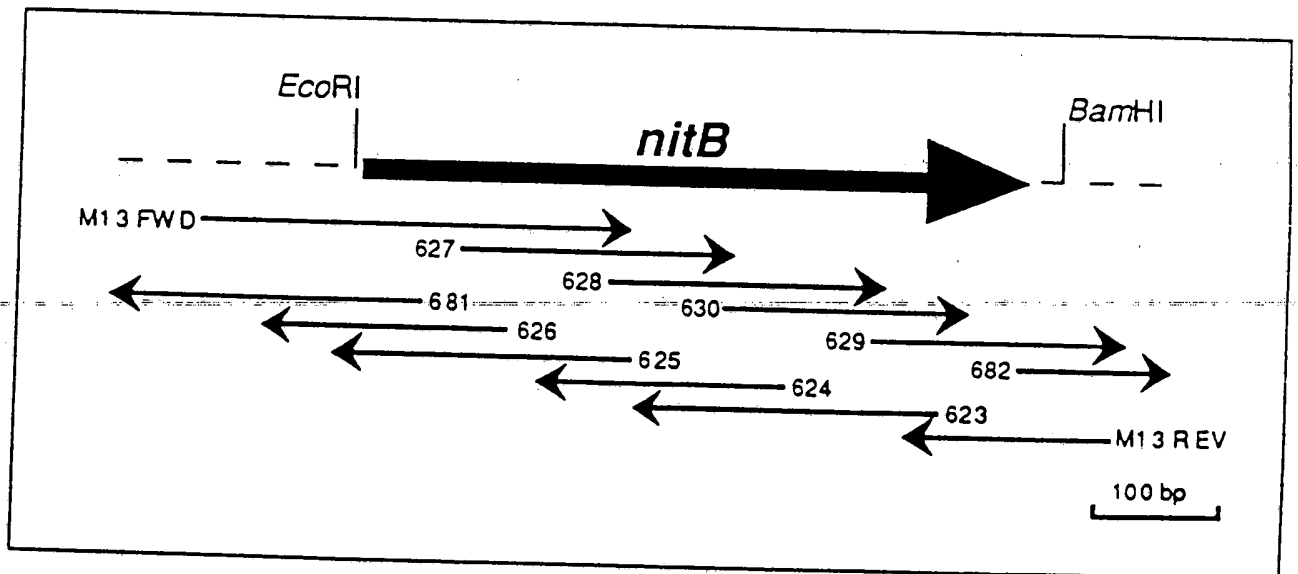
Obr. 2

23.04.99

3/7



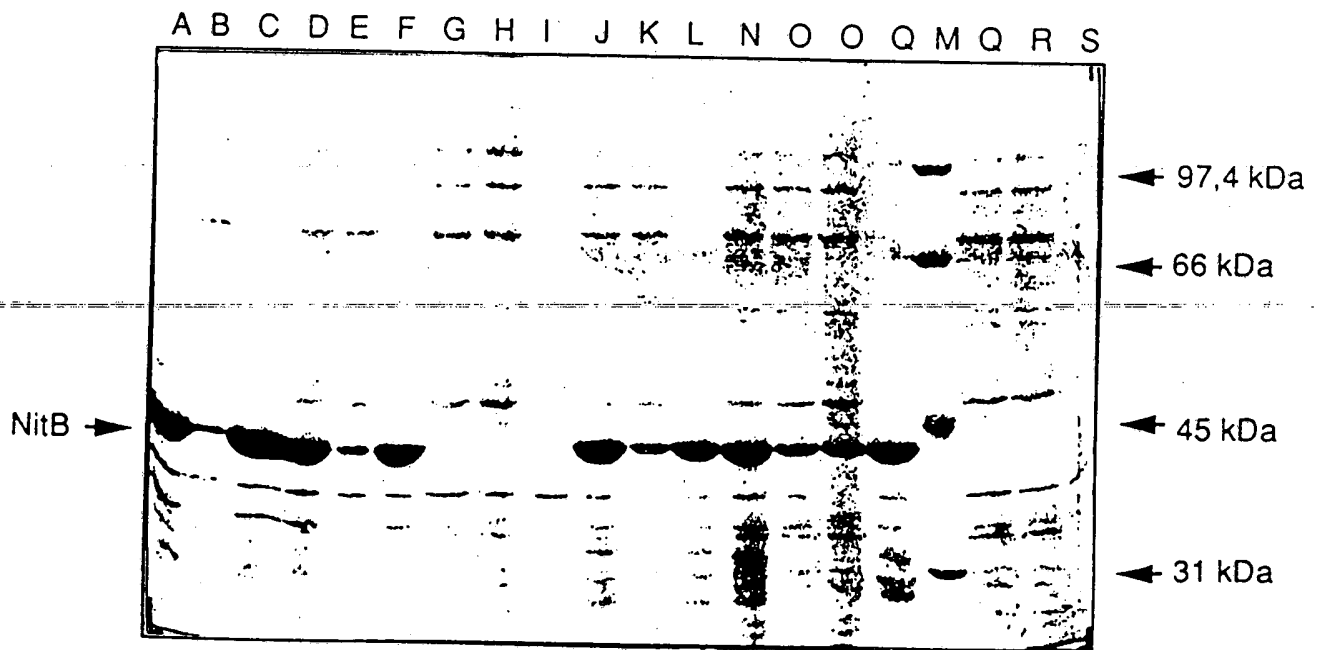
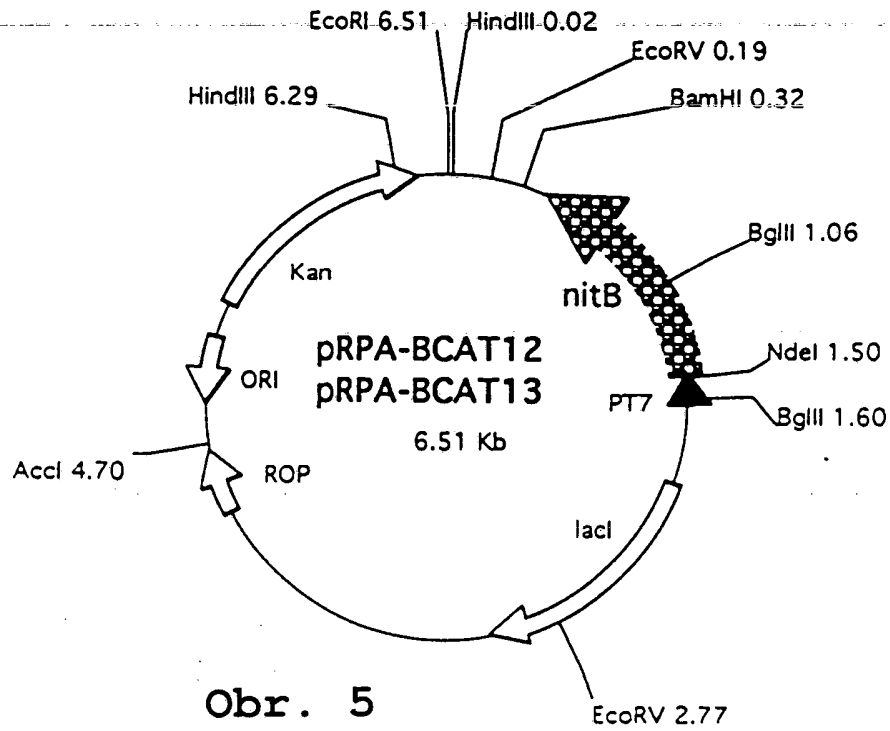
Obr. 3



Obr. 4

20.04.99

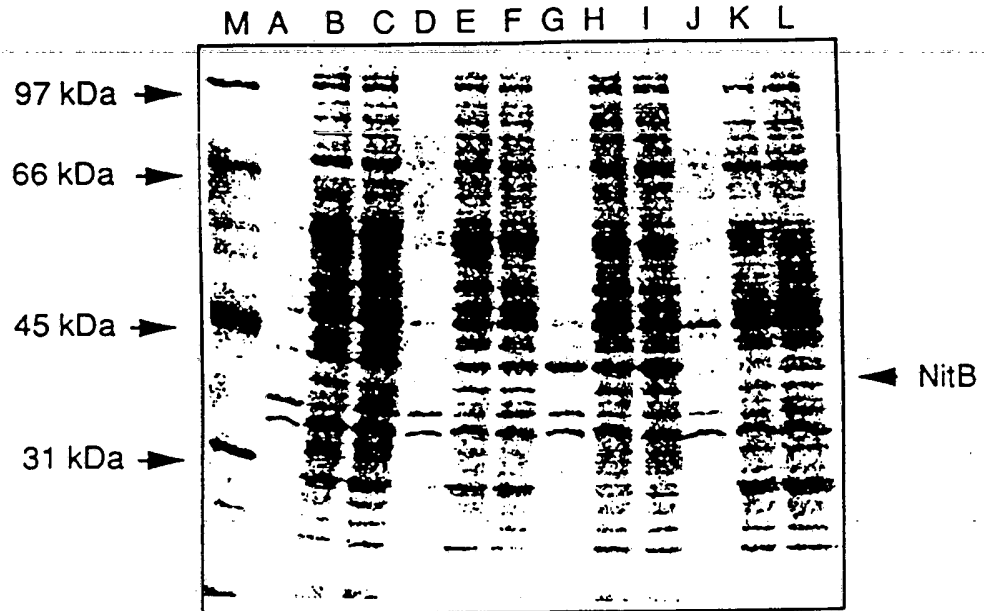
4/7



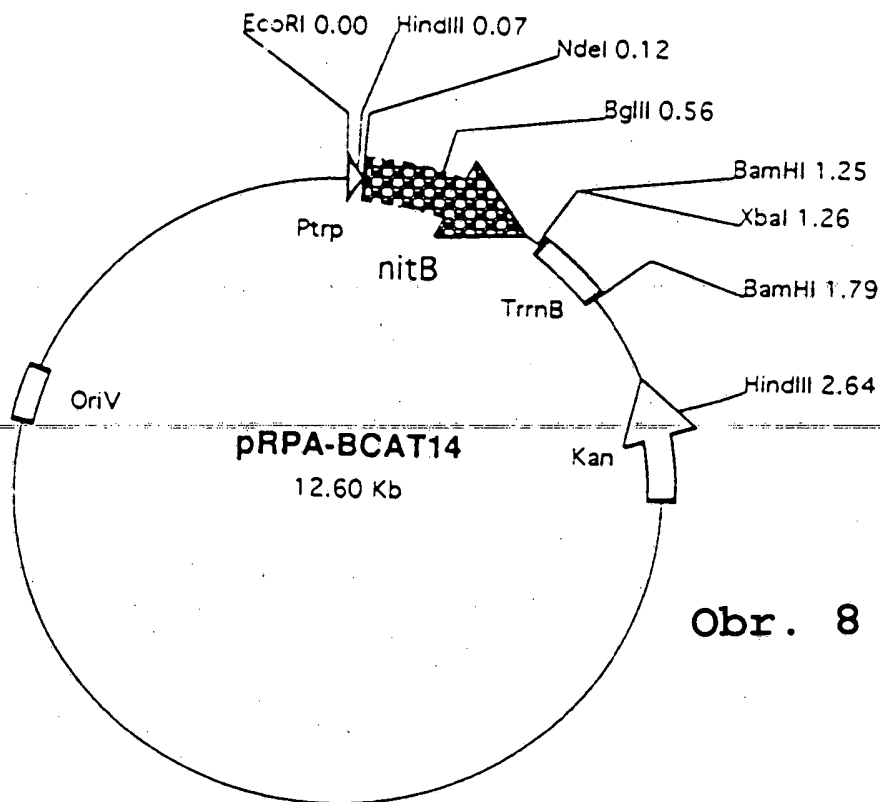
Obr. 6

23.04.99

5/7



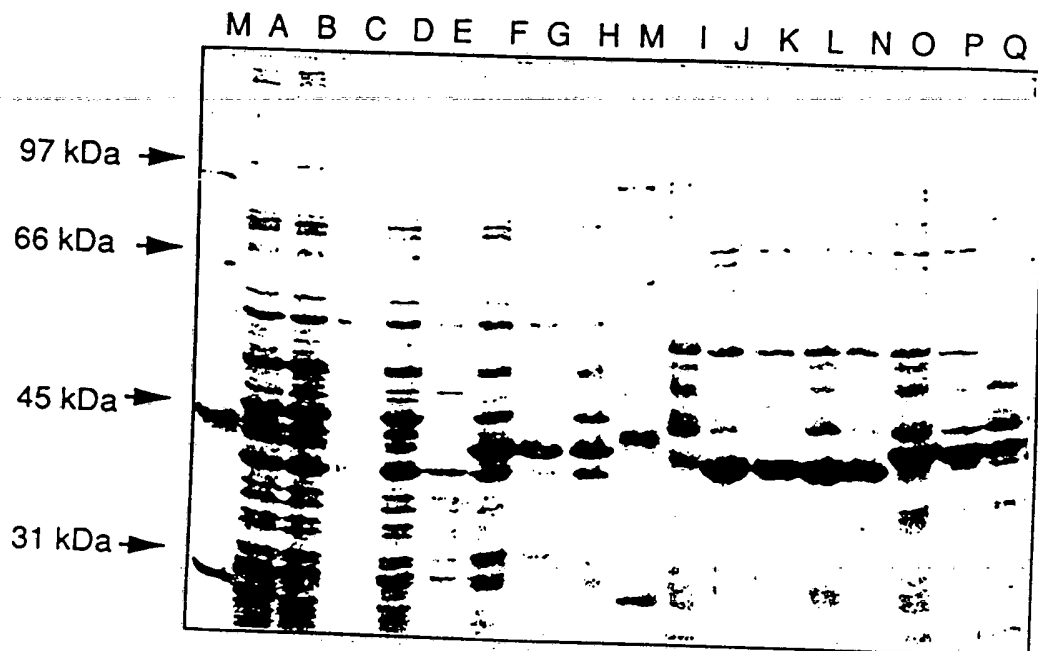
Obr. 7



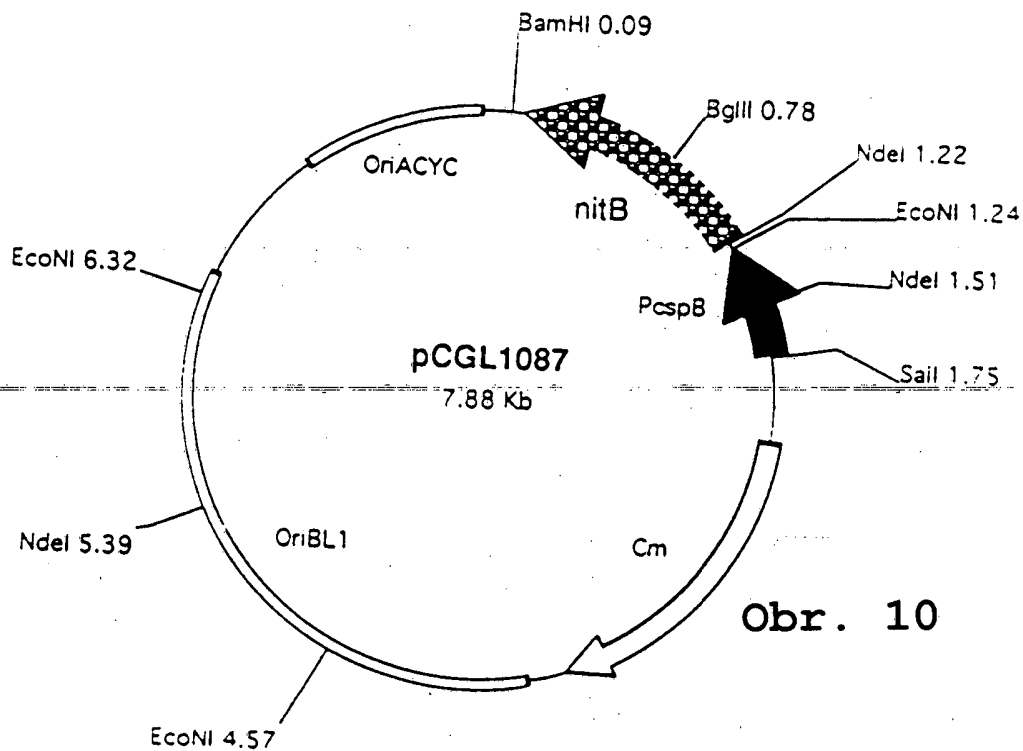
Obr. 8

23.04.99

6/7



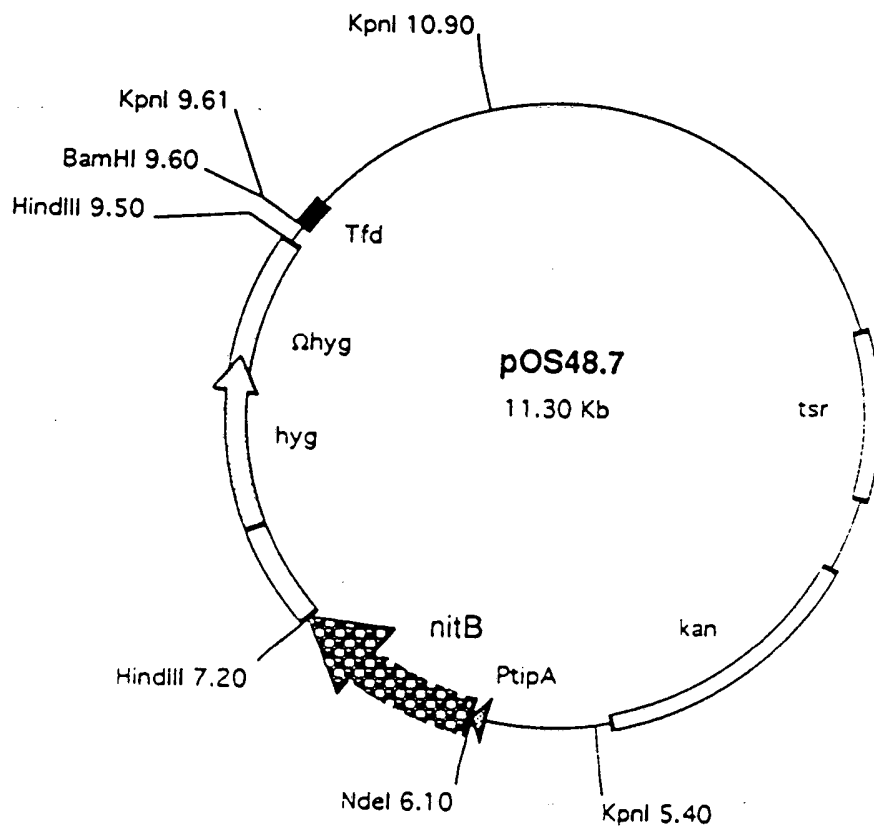
Obr. 9



Obr. 10

23.04.99

7/7



Obr. 11