



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

252560

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴

A 23 J 3/00
A 23 P 1/00

(22) Přihlášeno 23 03 85
(21) PV 2100-85

(40) Zveřejněno 12 02 87

(45) Vydáno 15 03 88

(75)

Autor vynálezu

MALANÍK VIKTOR RNDr. CSc., KOUŘIM, MAREK MIROSLAV ing. CSc., PRAHA,
MALANÍKOVÁ MARTA RNDr., KOUŘIM, PŠENIČKA IVAN RNDr., OPOLANY

(54) Heterogenní biokatalyzátory pro biotransformace a způsob jejich přípravy

Heterogenní biokatalyzátory pro biotransformace sestávají z enzymově aktivního biologického materiálu zabudovaného do gelu genu-carrageenanu. Způsob jejich přípravy spočívá v tom, že se enzymově aktivní biologický materiál převede po suspendování v solu 0,5 až 8 % hmotnostního genu-carrageenanu, s výhodou 1 až 3 % hmot. při teplotě 20 až 70 °C do chladného vytvrzovacího roztoku, ochlazeného na 4 až 15 °C, obsahujícího draselné, vápenaté, hlinité, amonné ionty nízkomolekulární látky obsahující aminoskupiny nebo jejich směs, nebo se sol genu-carrageenanu se suspendovaným enzymově aktivním biologickým materiálem převrství po ochlazení vytvrzovacím roztokem. Heterogenní biokatalyzátory jsou využitelné pro průmyslové biotransformace v potravinářském, farmaceutickém a chemickém průmyslu v kontinuálních a diskontinuálních biotechnologiích.

Vynález se týká heterogenních biokatalyzátorů na bázi imobilizovaných enzymů a buněk s různou enzymovou aktivitou a způsobu jejich přípravy. Heterogenní biokatalyzátory podle vynálezu jsou využitelné pro průmyslové biotransformace v potravinářském, farmaceutickém a chemickém průmyslu v kontinuálních i diskontinuálních biotechnologiích.

Pro přípravu biokatalyzátorů na bázi imobilizovaných enzymů a buněk byla vypracována řada postupů, které je možno v zásadě rozdělit na imobilizace na různé druhy nosičů (sorpci, chemisorpci, kovalentní vazbou a jejich kombinacemi), na tvorbu agregátů pomocí bifunkčních činidel a na postupy spočívající v zabudování enzymů či buněk od různých gelů, přírodních i syntetických.

Problematika imobilizace enzymů je podrobně popsána v mnoha monografiích a přehledných člancích, např. Wingard a spol.: *Immobilized Enzyme Principles*, Academic Press, New York (1976), Messing: *Immobilized Enzymes for Industrial Reactors*, Academic Press, New York (1975), Chibata: *Immobilized Enzymes, Research and Development*, Kodansha, Tokyo (1978), Marek a Káš: *Chem. průmysl* 34, 149 a 377 (1984); imobilizovaným buňkám jsou věnovány např. přehledné články Vojtíšek a Jirků: *Folia Microbiol.* 28, 309 (1983), Marek a Káš: *Chem. průmysl* 34, 546 (1984), Vandamme: *Chem. Ind.* 24, 1 072 (1976), Jack a Zajic: *Adv. Biochem. Eng.* 5, 126 (1977).

Imobilizace celých buněk má své opodstatnění zvláště v těch případech, kdy aplikovaný enzym je intracelulární, nestabilní v izolované formě, případně i ve formě imobilizovaného preparátu a kdy substrát i produkt katalyzované reakce jsou nízkomolekulární látky. Imobilizace buněk je dále zvláště výhodná pro mnohastupňové transformace zahrnující následné působení mnoha různých enzymů, případně i vhodnou regeneraci potřebných kofaktorů. Využití imobilizovaných buněk má oproti imobilizovaným enzymům též výhody ekonomického charakteru, poněvadž odpadá mnohdy nákladná izolace enzymu, v důsledku čehož je cena připraveného biokatalyzátoru nižší (Demnerová a spol.: *Chem. listy* 78, 199 (1984)).

Zatímco je u imobilizovaných enzymů nejčastěji používána jejich vazba na vhodný nosič, pro imobilizované buňky je nejběžnější jejich zabudování do matrice různých gelů ať již syntetického nebo přírodního původu.

Z hlediska technologických aplikací byl nejčastěji realizován způsob imobilizace buněk do polyakrylamidu (Chibata a spol.: *Appl. Microbiol.* 27, 878 (1974)). Biokatalyzátory připravené zabudováním různých mikroorganismů do syntetického gelu vytvořeného radikálovou polymerací akrylamidu s N,N' -metylen-bis-akrylamidem (USA pat. spis č. 3 791 926) byly použity pro mnohé biokonverze (výroba L-asparagové kyseliny, L-citrulinu, L-mléčné kyseliny atd.). Operační poločas připravených biokatalyzátorů činí až 120 dnů.

Uvedený postup přípravy biokatalyzátorů však má i řadu nevýhod. Dosud není znám způsob provedení polymerace, podle kterého by bylo možno připravit částice gelu sférického tvaru a alespoň přibližně shodné velikosti, které by zaručovaly optimální hydrodynamické vlastnosti biokatalyzátoru.

Největším nedostatkem uvedeného postupu je však skutečnost, že při i krátkodobým stykem buněčného materiálu s monomery akrylamidem a N,N' -metylen-bis-akrylamidem dochází často ke snížení příslušné enzymové aktivity. Ke ztrátám enzymové aktivity buněčného materiálu dochází též pod vlivem tepla, které se uvolňuje během polymerace. K nevýhodám imobilizace buněk do polyakrylamidu patří i nebezpečí, že látky vyrobené použitím takto připraveného biokatalyzátoru mohou obsahovat toxické zbytky nezpolymerovaných monomerů, což je u řady výrobků z hygienického a zdravotnického hlediska nepřijatelné.

Uvedené nevýhody biokatalyzátorů na bázi polyakrylamidu vedly k vypracování nového způsobu imobilizace buněk do matrice polysacharidů, z nichž výraznější uplatnění dosáhly alginan vápenatý (Kierstan a Bucke: *Biotechnol. Bioeng.* 19, 387 (1977)) a kappa-carrageenan. Vzhledem k tomu, že v řadě technologií není možná přítomnost vápenatých iontů (nerozpustnost substrátů

či produktů biotransformace ap.) nalezlo širší technologické uplatnění použití kappa-carrageenanu. Kappa-carrageenan je polysacharid, který se získává extrakcí mořských řas *Chondrus crispus* horkou vodou a následnou separací od lambda-carrageenanu pomocí frakční precipitace draselnými ionty (Rees: J. Chem. Soc., part II, 1963, 1821).

Kappa-carrageenan obsahuje D-galaktosu a 3,6-anhydro-D-galaktosu v molárním poměru 1,1 až 1,5 : 1 při obsahu jedné SO_3H skupiny na 2 až 2,5 monosacharidových jednotek. Lambda-carrageenan je složen hlavně z 1,3-D-galaktoso-2-sulfátu a 1,4-D-galaktoso-2,6-disulfátu. Pomocí draselných, amonných a jiných iontů či látek (Tosa a spol.: Biotechnol. Bioeng. 21, 1697 (1979)) je možno z kappa-carrageenanu vytvořit rigidní vytvrzené částice různých fyzikálních vlastností i tvarů, zatímco lambda-carrageenan v přítomnosti uvedených látek tyto struktury nevytváří.

Zabudováním buněk či jiného enzymově aktivního materiálu do gelu kappa-carrageenanu je pak připraven biokatalyzátor, který má vedle vysokého podílu zachované enzymové aktivity a velmi dobrých fyzikálních a hydrodynamických vlastností i značně vysokou stabilitu. V literatuře (Nishoda a spol.: Enzyme Microb. Technol. 6, 85 1984)) je pro biokatalyzátory připravené zabudováním mikrobiálních buněk do kappa-carrageenanu uváděn operační poločas až 680 dnů.

Zmíněné výborné vlastnosti těchto biokatalyzátorů vedly k postupné náhradě dříve realizovaných biotechnologií založených na bázi imobilizovaných buněk v polyakrylamidu postupy spojenými s biokatalýzou pomocí buněk imobilizovaných v kappa-carrageenanu. Nevýhodou těchto biokatalyzátorů je pouze relativně náročná izolace kappa-carrageenanu a s tím spojená poněkud vysoká cena tohoto materiálu.

Uvedený nedostatek je možno odstranit využitím heterogenních biokatalyzátorů podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že sestává z enzymově aktivního biologického materiálu zabudovaného do gelu genu-carrageenanu. Jako enzymově aktivní biologický materiál mohou tyto heterogenní biokatalyzátory obsahovat prokaryontní nebo eukaryontní buňky organismů, zejména grampozitivních, gramnegativních a gramlabilních bakterií, acidorezistentních bakterií, kvasinek, aktinomycet a dalších mikroskopických hub, popřípadě jejich fragmenty a podbuněčné částice, nesoucí enzymové aktivity, zejména hydrolázy, isomerasy, lyasy, oxidoreduktasy a jiné aktivity a/nebo částice celé sekvence enzymů logického sledu biochemické dráhy, zejména degradativního metabolismu, glykolysy, enzymů katalyzujících biotransformace hormonů a produkci antibiotik a alkaloidů, nebo směsi celých nativních buněk s jejich fragmenty, podbuněčnými částicemi a celým uvolněným obsahem buněk nebo z konjugátů celých buněk či jejich fragmentů a přidáných enzymů nebo samotných enzymů, enzymových konjugátů nebo syntetických glykoproteinů.

Předmětem vynálezu je dále způsob přípravy uvedených heterogenních biokatalyzátorů spočívající v tom, že se zmíněný enzymově aktivní biologický materiál suspenduje v solu genu-carrageenanu, suspenze se převede do gelovité formy vykazující dostatečnou pevnost biokatalyzátoru při zachování vysokého podílu enzymové aktivity pomocí draselných, amonných a jiných iontů gelovité částice různých tvarů, které mají vedle dostatečné pevnosti výborné hydrodynamické vlastnosti. Zabudováním enzymově aktivního biologického materiálu do gelu-carrageenanu je podle vynálezu připraven heterogenní biokatalyzátor, který má vedle vysoké enzymové aktivity i značnou stabilitu.

Způsobem podle vynálezu se enzymově aktivní biologický materiál suspendovaný v solu 0,5 až 8% genu-carrageenanu při teplotě 20 až 70 °C převede do vytvrzovacího roztoku ochlazeného na 4 až 15 °C nebo se nejdříve v tenké vrstvě ochladí a poté se převrství chladným vytvrzovacím roztokem a vytvrzený gel se poté převede na vhodnou velikost částic rozřezáním, případně rozmixováním. K vytvrzení gelu genu-carrageenanu se může s výhodou použít roztok obsahující draselné, amonné, vápenaté, hlinité či jiné nízkomolekulární látky, obsahující aminoskupiny jako příklad 1,6-diaminohexan, ethylendiamin, histamin, hydrazid nebo D,L-histidin.

Způsobem podle vynálezu se výhodně připravují heterogenní biokatalyzátory se sférickými

částicemi gelu vytvořené kapáním teplého solu genu-carrageenanu se suspendovaným enzymově aktivním biologickým materiálem přes vrstvu kapaliny s nižší specifickou hmotností než vytvrzovací roztok do tohoto vychlazeného roztoku, například přes vrstvu parafinového oleje do roztoku chloridu draselného.

Pro některé biotransformace je výhodné, zvláště v těch případech, kdy dochází během reakce k uvolňování plynu, aby byla dále zvýšena rigidita vytvořených částic gelu. Způsobem podle vynálezu se zvýší pevnost částic vytvořeného gelu zesíťněním jeho povrchové části přídatkem 1,6-diaminohexanu nebo polyetyleniminu či jiných látek obsahujících aminoskupiny a následným prokřížením glutaraldehydem. Pevnost částic gelu je možno zvýšit též zapolymerováním akrylamidu zesíťněného N,N'-metylen-bis-akrylamidem v povrchové nebo i podpovrchové části vytvořeného gelu.

Pořizovací náklady heterogenního biokatalyzátoru podle vynálezu jsou přitom ve srovnání s imobilizací do kappa-carrageenanu výrazně nižší, poněvadž cena genu-carrageenanu je s ohledem na jednodušší izolaci oproti kappa-carrageenanu přibližně 40krát menší. Další velkou výhodou je ve srovnání s jinými způsoby imobilizace možnost přípravy biokatalyzátoru bez použití jakýchkoliv toxických, potenciálně koncerogenních apod. látek, které by mohly produkt biotransformace kontaminovat.

Pro přípravu katalyzátorů se zaměřením na využití v potravinářském či farmaceutickém průmyslu je tato možnost zvláště významná. (Genu-carrageenan se běžně vyrábí pro potřeby potravinářského průmyslu.)

Způsobem podle vynálezu je možno i u biokatalyzátorů určených pro tyto oblasti aplikace zesíťnit gel vytvořených částic v celém jeho objemu přídatkem netoxických látek s vysokým obsahem hydroxylových skupin, například taninu. Tímto způsobem dochází k dalšímu zvýšení stability vytvořených biokatalyzátorů.

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

P ř í k l a d 1

Vlhká buněčná pasta produkčního kmene *Escherichia alcalescens* Asp 24 s aspartatamoniak lyasovou aktivitou 28,1 ukat/g vlhkých buněk byla rozmíchána ve fyziologickém roztoku tak, aby vznikla suspenze o obsahu 20 % hmot. vlhkých buněk. K suspenzi zahřáté na 50 °C bylo přidáno shodné množství (objem/objem) 5% roztoku genu-carrageenanu 55 °C teplého. Po důkladném promíchání byla směs ochlazená a převrstvena 0,5M roztokem chloridu amonného, vychlazeného na 10 °C. Po 24 hodinách byl vytvrzený gel rozmixován v mixéru a odfiltrován. U získaného biokatalyzátoru byla zjištěna aspartasová aktivita 2,17 ukat/g vlhkého vytvrzeného gelu.

P ř í k l a d 2

K suspenzi vlhkých buněk o obsahu 40 % hmot. buněk shodného kmene jako v příkladu 1, ohřáté na 45 °C, bylo přidáno třináásobné množství (objem/objem) 4% roztoku genu-carrageenanu 50 °C teplého. Směs byla důkladně promíchána a za tepla nakapána do chladného (10 °C) roztoku 0,3M chloridu draselného přes vrstvu parafinového oleje. Vzniklé kuličky gelu s imobilizovanými buňkami byly ponechány 24 h v 0,3M roztoku chloridu draselného (10 °C).

Ke kuličkám o průměru 2,5 mm byl po vychlazení na 5 °C a odfiltrování přidán v poměru 1:1 (objem/váha) vychlazený (5 °C) roztok obsahující 0,5M fosfátový pufr pH 7,0, 0,3M chlorid draselný a 0,085M 1,6-diaminohexan. Po pěti minutách míchání byl ke směsi přidán v poměru 0,5:1 (objem/váha kuliček) roztok obsahující 0,5M fosfátový pufr pH 7,0, 0,3M chlorid draselný a 0,085M glutaraldehyd. Po dalších 30 minutách míchání při 5 °C byly získané kuličky promyty vychlazeným roztokem 0,3 M chloridu draselného. U takto připraveného heterogenního biokatalyzátoru byla zjištěna aspartasová aktivita 1,7 ukat/g vlhkého biokatalyzátoru.

P ř í k l a d 3

Vlhká pasta buněk *Streptomyces nigrificans* s glukosaisomerasovou aktivitou 160 μ kat/g vlhkých buněk byla rozmíchána ve fyziologickém roztoku tak, aby vznikla suspenze o obsahu 30 % hmot. vlhkých buněk. K suspenzi ohřáté na 45 °C bylo přidáno dvojnásobné množství (objem/objem) 5% roztoku genu-carrageenanu 55 °C teplého. Po důkladném promíchání byla směs za tepla vylita na misku tak, aby vrstva gelu byla vysoká 5 až 6 mm. Ztuhlý gel byl převrstven roztokem 0,3M chloridu draselného a 0,085M ethylendiaminu. Po 18 h stání byl vytvrzený gel rozřezán na částice cca 5x5x5 mm, převrstven roztokem 0,3M chloridu draselného a 0,085M glutaraldehydu a po 30 min. míchání byl odsát a promyt 0,3M KCl. U získaného biokatalyzátoru byla zjištěna glukosaisomerasová aktivita 10 μ kat/g vlhkého biokatalyzátoru.

P ř í k l a d 4

Z vlhké hmoty buněk *Aspergillus niger* vykazujících glukosaoxidasovou aktivitu 120 μ kat/g vlhkých buněk byla připravena podle příkladu 3 vrstva gelu, která byla převrstvena roztokem 0,2M chloridu draselného, 0,2M chloridu amonného a 0,05M histaminu. Po 24 h stání byl gel rozřezán na částice 5x5x5 mm. K tomuto gelu byl přidán roztok obsahující 4 % hmot. akrylamidu, 0,8 % hmot. methylen-bis-akrylamidu a 0,5 % hmot. 3-dimethylaminopropionitrilu (stejný podíl objemu roztoku a váhy gelu). Po 15 min. byly částice gelu převedeny do 0,5% roztoku persíranu draselného. Po 30 minutách míchání byly částice gelu odfiltrovány a řádně promyty vodou. U získaného heterogenního biokatalyzátoru byla zjištěna glukosaoxidasová aktivita 5 μ kat/g vlhkého materiálu.

P ř í k l a d 5

K suspenzi vlhkých buněčných stěn kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* obsahující 60 % hmot. sušiny o invertasové aktivitě 850 μ kat/g vlhkého materiálu, ohřáté na 55 °C, bylo přidáno shodné množství (objem/objem) 5% genu--carrageenanu 60 °C teplého. Po promíchání byl ke směsi přidán roztok taninu o hmotnostní koncentraci 1 % ve fyziologickém roztoku tak, aby výsledná koncentrace taninu v gelu byla 0,1 %. Směs byla opět promíchána a poté za tepla nakapána přes vrstvu parafinového oleje do chladného (10 °C) roztoku 0,3M chloridu draselného. Vytvořené kuličky průměru 2 mm byly ponechány 24 h v 0,3M chloridu draselném. Po vyjmutí z tohoto roztoku byl získán biokatalyzátor s invertasovou aktivitou 225 μ kat/g vlhké hmoty.

P ř í k l a d 6

K 10 dílům roztoku s obsahem 4 % hmot. genu-carrageenanu ohřátém na 50 °C obsahujícího 0,1 % hmot. taninu byl přidán 1 díl (objem/objem) 3-galaktosidasy o aktivitě 2 mkat/ml. Postupem podle příkladu 5 byl připraven heterogenní biokatalyzátor sférických částic průměru 2 mm s 3-galaktosidasovou aktivitou 97 μ kat/g vlhkého biokatalyzátoru.

P ř í k l a d 7

K 1 dílu vlhkých buněčných stěn kvasinky *Saccharomyces uvarum* bylo přidáno 10 dílů (objem/váha buněčných stěn) 0,05M fosfátového pufru pH 6 a 3 díly 0,05M jodistanu sodného. Po 6 h třepání při 4 °C za nepřístupu světla byly oxidované buněčné stěny odstředěny a promyty 0,05M fosfátovým pufrům pH 7,5. K 1 dílu oxidovaných buněčných stěn bylo přidáno 10 dílů (objem/váha) roztoku glukosoxidasy v 0,05M fosfátovém pufru pH 7,5 obsahující 2,4 mg bílkoviny v 1 ml. Po 16 h třepání při 4 °C byly buněčné stěny s navázaným enzymem odstředěny a resuspendovány ve 3 dílech (objem/váha) fyziologického roztoku. Po vytemperování na 40 °C byla suspenze přidána ke shodnému objemu gelu s obsahem 4 % hmot. genu-carrageenanu vyhřátému na 50 °C. Po promíchání byla směs ochlazená a převrstvena 0,3M roztokem chloridu draselného, vychlazeného na 10 °C. Po 24 h byl vytvrzený gel rozmixován v mixéru a odfiltrován. U získaného heterogenního biokatalyzátoru byla zjištěna invertasová aktivita 128 μ kat/g na 1 g vlhkého materiálu a glukosaoxidasová aktivita 36 μ kat na 1 g vlhkého biokatalyzátoru.

P ř í k l a d 8

K suspenzi s obsahem 50 % hmot. vlhkých buněk *Saccharomyces cerevisiae* ohřáté na 45 °C bylo přidáno třináásobné množství (objem/objem) roztoku s obsahem 4 % hmot. genu-carrageenanu 50 °C teplého. Po důkladném promíchání byla směs za tepla nakapána do chladného roztoku (10 °C) 0,25M chloridu vápenatého. Vytvořené částice gelu s imobilizovanými kvasinkami byly ponechány 24 h v 0,25M roztoku chloridu vápenatého. U vytvořeného biokatalyzátoru byla zjištěna produkce 10 mg ethanolu za 1 na 1 g vlhkého gelu.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Heterogenní biokatalyzátory pro biotransformaci s enzymově aktivním biologickým materiálem vyznačující se tím, že sestávají z enzymově aktivního biologického materiálu, jako jsou prokaryontní nebo eukaryontní buňky organismů, zejména bakterií, kvasinek, aktinomycet a dalších mikroskopických hub, popřípadě jejich fragmenty, nesoucí enzymové aktivity, případně celé sekvence enzymů logického sledu metabolické dráhy nebo směsi celých nativních buněk s jejich fragmenty nebo z konjugátů celých buněk či jejich fragmentů a přidáných enzymů, nebo ze samotných enzymů, enzymových konjugátů nebo syntetických glykoproteinů, zabudovaného do gelu-carrageenanu.

2. Způsob přípravy heterogenních biokatalyzátorů podle bodu 1 vyznačující se tím, že se enzymově aktivní biologický materiál převede po suspendování v solu 0,5 až 8 % hmotnostního genu-carrageenanu, s výhodou 1 až 3 % hmot. při teplotě 20 až 70 °C do chladného vytvrzovacího roztoku, ochlazeného na 4 až 15 °C, obsahujícího draselné, vápenaté, hlinité, amonné ionty látky obsahující aminoskupiny nebo jejich směs, nebo se sol genu-carrageenanu se suspendovaným enzymově aktivním biologickým materiálem převrství po chlazení vytvrzovacím roztokem.

3. Způsob přípravy podle bodu 1 nebo 2 vyznačující se tím, že se enzymově aktivní biologický materiál suspenduje v solu genu-carrageenanu za přítomnosti látek s obsahem hydroxylových skupin, s výhodou taninu, v koncentraci 0,1 až 5 % hmot.

4. Způsob přípravy podle bodů 1 až 3 vyznačující se tím, že se sol genu-carrageenanu se suspendovaným enzymově aktivním biologickým materiálem kape přes vrstvu kapaliny se specifickou hmotností nižší než vytvrzovaný roztok, například přes vrstvu parafinového oleje, do vychlazeného vytvrzovacího roztoku obsahujícího roztok chloridu draselného o koncentraci 0,3 mol/litr.

5. Způsob přípravy heterogenních biokatalyzátorů podle bodů 1 až 4 vyznačující se tím, že se na částice vytvořeného gelu genu-carrageenanu s imobilizovaným enzymově aktivním biologickým materiálem působí 1,6-diaminohexanem, nebo polyethyleniminem či látkou obsahující dvě nebo více aminoskupin, na vzniklé látky se pak působí glutaraldehydem.

6. Způsob přípravy heterogenních biokatalyzátorů podle bodů 1 až 4 vyznačující se tím, že se částice vytvořeného gelu genu-carrageenanu zapolymerují akrylamidem ve směsi s N,N'-metylen-bis-akrylamidem.