

(19)



(10) **LT 3366 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **3366**

(51) Int.Cl.⁵: **C12N 11/00,
C12P 21/02**

(21) Paraiškos numeris: **IP1077**

(22) Paraiškos padavimo data: **1993 09 22**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **1995 04 25**

(45) Patento paskelbimo data: **1995 07 25**

(60) SU duomenys: **PCT/US 91/05415, 1991 07 30**

(31,32,33) Prioritetas: **562280, 1990 08 03, US**

(72) Išradėjas:

**Manuel A. Navia, US
Nancy L. St. Clair, US**

(73) Patento savininkas:

**VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED, 40 Allston Street, Cambridge, MA
02139-4211, US**

(74) Patentinis patikėtinis:

**Marius Jakulis-Jason, 3, A.A.A.Baltic Service Company, Rūdninkų g. 18/2-12, 2001
Vilnius, LT**

(54) Pavadinimas:

Kristalai su skersiniais susiuvimais kaip nauja fermentų imobilizacijos forma

(57) Referatas:

Fermentų imobilizavimo metodas, formuojant fermentų kristalus ir, bendresniu atveju, sudarant gautuose kristaluose skersinius susiuvimus, bifunkcinių reagentų pagalba; susiūti, imobilizuoti fermentų kristalai (CLEC), padaryti pagal šį metodą; liofilizuoti, susiūti, imobilizuoti fermentų kristalai (CLEC) ir reikalingų produktų gamybos metodas, panaudojant CLEC ar CLEC katalizuojamas reakcijas.

Šis išradimas yra apie fermento imobilizavimo būdą, pagal kurį suformuojami kristalai ir, bendru atveju kristalas susiuvamas (sudaromi skersiniai ryšiai tarp kristalą sudarančių baltymo molekulių (šiam procesui pažymėti čia naudojamas terminas skersinis susiuvimas arba tiesiog susiuvimas)), panaudojant bifunkcinį reagentą; susiūtus imobilizuotus fermentų kristalus (toliau trumpintai CLEC arba CLIEC), gautus šiuo būdu; CLEC liofilizaciją, kaip priemonę pagerinančią imobilizuotų fermentų saugojimo, priežiūros ir panaudojimo savybes ir apie norimo produkto gavimo būdą, panaudojant reakcijas katalizuojamas CLEC ar CLEC rinkiniais.

Fermentai naudojami kaip katalizatoriai pramoninio bei laboratorinio masto aukštos kokybės ir specializuotų cheminių medžiagų pramoninėje gamyboje (Jones. J.B., Tetrahedron 42: 3351-3403 (1986)), maisto produktų gamyboje (Zaks ir kt., Trends in Biotechnology 6: 272-275 (1988)), ir kaip įrankis organinių junginių sintetinimui (Wong, C.-H., Science 244: 1145-1152 (1989); CHEMTRACTS-Org. Chem. 3: 91-111 (1990); Klibanov, A.M., Acc. Chem. Res. 23: 114-120 (1990)).

Gamyba, paremta fermentų panaudojimu, gali žymiai sumažinti aplinkos teršimo našta, pasireiškiančią plataus masto gamyba kitur nepanaudojamų tarpinių chemikalų, kaip parodyta plataus masto akrilamido gamyboje, panaudojant fermentą nitrilo hidratazę (Nagasawa, T. ir Yamada, H., Trends in Biotechnology 7: 153-158 (1989)).

Fermentai taip pat panaudojami kaip biosensoriai, įvairių medžiagų aptikimui klinikiniams, pramoniniams bei kitiems poreikiams (Hall, E., "Biosensors", Open University Press (1990)). Klinikinių tyrimų srityje fermentai gali būti panaudoti ekstrakorporalinėje

terapijoje, pavyzdžiui hemodializėje ir hemofiltra-
cijoje, kur fermentai selektyviai pašalina
nereikalingas ir toksines medžiagas iš kraujo (Klein,
M., Langer, R., Trends in Biotechnology 4: 179-
5 185 (1986)). Fermentai naudojami šiose srityse todėl,
kad jie efektyviai katalizuoja daugelio tipų reakcijas
prie vidutinių temperatūrų, be to jie yra specifiški
substratui ir stereoselektyvūs. Vis dėlto, tirpių
fermentinių katalizatorių vartojimas turi trūkumų,
10 kurie riboja fermentų panaudojimą pramoniniuose ir
laboratoriniuose cheminiuose procesuose (Akiyama ir
kt., CHEMTECH 627-634 (1988)).

Fermentai yra brangūs ir santykinai nestabilūs,
15 lyginant su dauguma pramoninių ir laboratorinių
katalizatorių, net kai jie naudojami vandeninėje
terpėje, kurioje paprastai fermentai funkcionuoja.
Daugumas iš ekonomiškai vertingesnių cheminių reakcijų,
plačiai vykdomų praktikoje, nesuderinamos su vandenine
20 terpe, kurioje, pvz., dažnai substratai ir produktai
yra netirpūs ar nestabilūs ir kurioje hidrolizė gali
turėti didelę įtaką. Be to, kad išgauti fermentinį
katalizatorių iš produkto ir nesureagavusio substrato,
esančio žaliavoje, dažnai reikia panaudoti sudėtingą ir
25 brangią atskyrimo technologiją. Galiausiai, fermentus
sunku išsaugoti, išlaikant jų aktyvumą komerciškai
priimtinam laikotarpiui (nuo mėnesių iki metų), be jų
užšaldymo (nuo 4°C iki -80°C ir iki skysto azoto
temperatūros) arba be laikymo vandeniniuose tirpik-
30 liuose su atitinkama jonine galia, pH ir t.t.

Fermentų imobilizacijos būdai, dauguma atvejų, leidžia
išvengti šių problemų. Imobilizacija gali pagerinti
fermentinių katalizatorių stabilumą ir apsaugoti jų
35 funkcionalinį integralumą agresyvių tirpiklių aplinkoje
bei ekstremaliose temperatūrose, t.y. sąlygose, kurios
būdingos pramoniniams ir laboratoriniams cheminiams

procesams (Hartmeier, W., Trends in Biotechnology 3: 149-153 (1985)). Nenutrūkstamo srauto procesai gali vykti kolonose su imobilizuoto fermento dalelėmis, pavyzdžiui, kai tirpi žaliava praeina pro tas daleles ir palaipsniui virsta produktu.

Šiame aprašyme, terminas fermentų imobilizacija reiškia fermentinio katalizatoriaus pervedimą į netirpią būseną, panaudojant prijungimą, inkapsuliaciją arba agregaciją į makroskopines (10^{-1} mm) daleles.

Literatūroje pasirodė eilė vertingų fermentų imobilizacijos būdų apžvalgų (Maugh, T.H., Science 223: 474-476 (1984); Tramper, J., Trends in Biotechnology 3: 45-50 (1985)). Maugh aprašė penkis bendrus fermentų imobilizacijos būdus. Tarp jų: adsorbavimas kietuose nešikliuose (tokiuose kaip jonitinės dervos); kovalentinis prijungimas prie nešiklių (tokių kaip jonitinės dervos, poringa keramika arba stiklo rutuliukai); surišimas polimeriniuose geliuose; inkapsuliacija; ir tirpių baltymų nusodinimas, sudarant tarp jų atsitiktinius ir neapibrėžtus skersinius ryšius bifunkcinių reagentų pagalba. Be to, galima imobilizuoti ištisas ląsteles (paprastai negyvas arba padarytas pralaidžiomis), kurios parodė gero lygio aktyvumą (pvz., Nagasawa, T. ir Yamada, H., Trends in Biotechnology 7: 153-158 (1989)).

Kiekviena iš šių imobilizacijos procedūrų turi savo privalumus ir apribojimus ir nei viena iš jų negali būti laikoma optimalia ar dominuojančia. Daugumoje jų, pats fermentinis katalizatorius galiausiai tesudaro tik mažą dalį viso tūrio, kuri užima medžiaga, esanti cheminiame reaktoriuje. Iš esmės, didžiąją dalį imobilizuotos terpės sudaro inertiška, tačiau dažnai brangi nešiklio medžiaga. Visuose būduose imobilizuojančios sąveikos tarp fermentinio katalizatoriaus

molekulių ir/arba jų sąveika su nešiklio medžiaga turi polinkį į atsitiktinumą ir neapibrėžtumą. To pasekoje, nors šios sąveikos ir padidina tam tikru laipsniu fermentinio katalizatoriaus molekulių stabilumą, dėl santykinio jų nespecificiškumo ir netaisyklingumo gauta stabilizacija yra suboptimali ir netolygi. Daugumoje atvejų, pablogėja priėjimas prie fermentinio katalizatoriaus aktyvaus centro. Be to, aprašytieji imobilizacijos būdai neišsprendžia saugojimo ir šaldymo problemų. Kaip taisyklė, tradiciniais būdais imobilizuotais fermentais negalima laisvai manipuluoti, pavyzdžiui, pakeisti vieną tirpiklį į kitą, be rizikos suardyti struktūrinį ir funkcinį fermento integralumą. Praktiškai, išskyrus tą atvejį, kai prie nešiklio dalelių prijungiama rišančioji grupė, tradiciškai imobilizuoti fermentai labai panašūs į tirpius fermentus ir, kad pastarieji, turi polinkį denatūruotis bei praranda funkcinės savybės agresyviose aplinkose. Bendru atveju, imobilizacijos būdai sumažina fermento katalizuojamos reakcijos greitį, lyginant su gaunamu tirpikliuose. Tai apsprendžia apribojimai, susiję su substrato difuzija į imobilizuoto fermento daleles ir produkto difuzija iš jų (Quioco, F.A., ir Richards F.M., Biochemistry 5: 4062-4076 (1967)). Neišvengiamas inertinio nešiklio buvimas dalelėse su imobilizuotu fermentu prailgina vidutinį laisvą kelią tarp imobilizuoto fermento dalelių išorės su tirpikliu ir fermentinio katalizatoriaus aktyvaus centro ir, tuo būdu, pasunkina šias difuzijos problemas. Imobilizuotų ląstelių atveju, difuzijos problemos ypač sunkios, net jei ląstelių sienelės ir membranos tuo ar kitu būdu padarytos pralaidžiomis substratui ir produktui. Be to, reikia įvertinti daugybę pašalinių fermentinių aktyvumų, esančius ląstelėje metabolitus ir toksinus, o taip pat, ląstelės stabilumą darbinėje aplinkoje su agresyviais tirpikliais ir ekstremaliomis temperatūromis. Patobulinta imobilizacijos metodika, kuri

išvengia apribojimų, būdingų šiuo metu egzistuojantiems būdams, būtų naudinga skatinant fermentų, kaip pramoninių katalizatorių, vartojimą, ypač, jei būtų parodytas jos naudingumas plataus masto gamyboje (Daniels, M.J., Methods in Enzymology 136: 371-379 (1987)).

Šio išradimo būde, nedideli (10^{-1} mm) baltymo kristalai iš vandeninių tirpalų arba vandeninių tirpalų su organiniais tirpikliais, kuriuose fermentinis katalizatorius išlieka struktūriškai ir funkciškai stabilus. Labiau priimtiname išpildyme, kristalai yra susiuvami su bifunkciniu reagentu, tokiu kaip glutaraldehydas. Šis susiuvimas stabilizuoja kristalinės gardelės kontaktus tarp atskirų fermento molekulių, sudarančių šį kristalą. Šios papildomos stabilizacijos dėka, susiūti imobilizuotų fermentų kristalai gali funkcionuoti pakeltose temperatūrose, ekstremaliuose pH ir agresyviose vandeninėse, organinėse ar beveik bevandeninėse terpėse, tame tarpe ir jų mišiniuose. Tuo būdu, šio išradimo CLEC gali veikti aplinkose, kuriose nekristalizuoti, nesusiūti, natyvūs fermentai ar tradiciniais būdais imobilizuoti fermentiniai katalizatoriai negali išlaikyti savo funkcinio integralumo.

Be to, su CLEC, gautais šiuo būdu, galima atlikti liofilizaciją ir gauti liofilizuotus CLEC, kurie tokioje liofilizuotoje būsenoje gali būti laikomi ilgesnį laikotarpį nešaltoje (kambario) temperatūroje ir kurie gali lengvai atsistatyti pasirinktame vandeniniame, organiniame ar maišytame vandeniniame-organiniame tirpiklyje, be amforinės suspensijos suformavimo ir su minimalia denatūracijos rizika.

Šis išradimas taip pat susijęs su CLEC, gautais aprašytu būdu ir jų panaudojimu laboratorinėje bei

plataus masto pramoninėje gamyboje pasirinktų medžiagų, tokių kaip chiralinės organinės molekulės, peptidai, angliavandeniniai, lipidai ar kiti cheminiai junginiai. Šiuo metu, tos medžiagos paprastai gaunamos tradiciniaisiais cheminiais būdais, kurie reikalauja agresyvių sąlygų (pvz.: vandeninių, organinių ar beveik bevandenių tirpiklių, mišrių vandens-organinių tirpiklių arba aukštų temperatūrų), nesuderinamų su nekristalizuotų, nesusiūtų, natyvių fermentinių katalizatorių funkciniu integralumu. Kitos makromolekulės, turinčios katalitinį aktyvumą, taip pat gali būti įtrauktos į pasiūlytą CLEC technologiją. Tai gali būti kristalizuojantys antikūniai (Lerner, R.A., Benkovic, S.J., ir Schultz, P.G., Science 252: 659-667 (1991)) ir katalizuojantys polinukleotidai (Cech T.R., Cell 64: 667-669 (1991); Celander, D.W., and Cech, T.R., Science, 251: 401-407 (1991)).

Šis išradimas taip pat susijęs su pasirinktų produktų gamybos būdu, panaudojant reakcijas, kurias katalizuoja šio išradimo CLEC.

Praktiniame šio išradimo būdo pavyzdyje dipeptidilinio dirbtinio saldintojo, aspartamo, chiralinio pirmtako sintezei buvo panaudotas fermentas termolizinas, cinko metaloproteazė. Termolizinas buvo kristalizuotas iš vandeninio 45% dimetilsulfoksido ir 55% 1.4M kalcio acetato, 0,05M natrio kakodilato, prie pH 6,5. Iš gautų kristalų buvo suformuoti termolizino CLEC, susiuvant su glutaraldehidu. Po to termolizino CLEC buvo perkeltas iš vandeninio kristalizacijos tirpalo, kuriame jis buvo pagamintas, į etilacetato tirpalą, turintį substratus, N-(benziloksikarbonil)-L-asparagino rūgštį (Z-L-Asp) ir L-fenilalanino metilo esterį (L-Phe-OMe). Termolizino CLEC panaudotas katalizuoti šių dviejų substratų kondensacijos reakciją susintetinti N-(benziloksi-karbonil)-L-aspartil-L-fenilalanino metilo esterį (Z-L-

Asp-L-Phe-OMe), kuris yra dirbtinio saldintojo aspartamo dipeptidilinis pirmtakas. Naudojant bet kurią iš daugelio žinomų būdų (žr. pvz., Lindeberg, G., J. Chem. Ed. 64: 1062-1064 (1987)), galima nuimti apsaugą
5 nuo L-asparagino rūgšties, esančios susintetintame dipeptidiliniame pirmtake, pašalinant benziloksi-karbonilo (Z-) grupę ir tokiu būdu gauti aspartamą.

Antrame praktiniame šio išradimo būdo pavyzdyje
10 fermentas termolizinas buvo panaudotas termolizino CLEC gavimui. Gautų CLEC aktyvumas ir stabilumas buvo palyginti su tomis pačiomis tirpiais termolizino charakteristikomis prie optimalių sąlygų, o taip pat
15 prie sąlygų su ekstremaliomis pH ir temperatūra, po inkubavimo organiniuose tirpikliuose ir po inkubavimo tirpale su su egzogenine proteaze.

Fermentas termolizinas buvo kristalizuotas iš 1,2M kalcio acetato ir 30% dimetilsulfoksido tirpalo, prie
20 pH 8,0. Iš gautų kristalų buvo suformuoti termolizino CLEC, susiuvant su 12,5% glutaraldehidu. Po to termolizino CLEC buvo liofilizuotas, naudojant standartinę procedūrą (Cooper, T.G., The Tools of Biochemistry, pp. 379-380 (John Wiley and Sons, NY
25 (1977)), ir buvo gautas liofilizuotas termolizino CLEC. Po to šis liofilizuotas CLEC buvo tiesiogiai perkeltas į įvairius pasirinktus vandeninius, organinius ar maišytus vandens-organinius tirpiklius, be tarpinės tirpiklių keitimo procedūros, be amorfinių suspensijų
30 formavimo ir su minimalia denatūracijos rizika. Tarp šių tirpiklių buvo acetonitrilas, dioksanas, acetonas ir tetrahidrofuranas, bet galima panaudoti ir kitus. Po inkubacijos, aktyvumas buvo tiriamas spektrofotometriniu būdu, skaidant dipeptidinį substratą FAGLA
35 (furilakriloil-glicil-L-leucino amida).

- 5 Trečiame praktiniame šio išradimo būdo pavyzdyje fermentas elastazė (iš kiaulės kasos) buvo kristalizuotas iš 5,5 mg/ml baltymo, 0,1M natrio acetato vandeninio tirpalo, prie pH 5,0 ir kambario temperatūroje (Sawyer, L. ir kt., J. Mol. Biol. 118: 137-208). Iš gautų kristalų buvo suformuoti elastazės CLEC, susiuvant su 5% glutaraldehydu. Elastazės CLEC buvo liofilizuotas kaip aprašyta 2 pavyzdyje.
- 10 Ketvirtame praktiniame šio išradimo būdo pavyzdyje, kaip čia atskleista, fermentas esterazė (iš kiaulės kepenų) buvo kristalizuotas iš 15 mg/ml baltymo ir 0,25M kalcio acetato vandeninio tirpalo, prie pH 5,6 ir kambario temperatūroje. Iš gautų kristalų buvo
- 15 suformuoti esterazės CLEC, susiuvant su 12,5% glutaraldehydu. Esterazės CLEC buvo liofilizuotas kaip aprašyta 2 pavyzdyje.
- 20 Penktame praktiniame šio išradimo būdo pavyzdyje, kaip čia parodyta, fermentas lipazė (*Geotrichum candidum*) buvo kristalizuotas iš 20 mg/ml baltymo, 0,50M Tris vandeninio tirpalo, prie pH 7 ir kambario temperatūroje. Iš gautų kristalų buvo suformuoti lipazės CLEC, susiuvant su 12,5% glutaraldehydu. Lipazės CLEC buvo
- 25 liofilizuotas kaip aprašyta 2 pavyzdyje.
- 30 Šeštame praktiniame šio išradimo būdo pavyzdyje fermentas lizocimas (iš vištos kiaušinio baltymo) buvo kristalizuotas iš 40 mg/ml baltymo, 40 mM natrio acetato buferio, turinčio 5% natrio chlorido, vandeninio tirpalo, prie pH 7,4 ir kambario temperatūros (Blake, C.C.F. ir kt., Nature, 196: 1173 (1962)). Iš gautų kristalų buvo suformuoti lizocimo CLEC, susiuvant su 20% glutaraldehydu. Lizocimo CLEC buvo
- 35 liofilizuotas kaip aprašyta 2 pavyzdyje.

Septintame praktiniame šio išradimo būdo pavyzdyje fermentas asparaginazė (*Escherichia coli*) buvo kristalizuotas iš 25 mg/ml baltymo, 50 mM natrio acetato ir 33% etanolio vandeninio tirpalo, prie pH 5,0 ir ir 4°C. Kristalizacijai panaudota modifikuota procedūra, aprašyta Grabner ir kt. [U.S. Patent 3664926 (1972)]. Iš gautų kristalų buvo suformuoti asparaginazės CLEC, susiuvant su 7,5% glutaraldehidu. Asparaginazės CLEC buvo liofilizuotas kaip aprašyta 2 pavyzdyje.

Panašiai gali būti imobilizuotos ir panaudotos atitinkamų reakcijų katalizei liuciferazė ir ureazė. Kiti fermentai, tokie kaip nurodyti 1-5 lentelėse, taip pat gali būti kristalizuoti ir susiūti pagal šį būdą, o gauti CLEC gali būti panaudoti kristalizavimui reakcijų, kurių pagalba gaunamas pasirinktas produktas, arba reakcijų, kurios yra tarpinis žingsnis (t.y. viena iš eilės reakcijų) pasirinkto produkto gamyboje. Kaip žinoma, nors skersinis susiuvimas padeda stabilizuoti daugumą kristalų, jis nėra būtinas ar pageidautinas visais atvejais. Kai kurie kristaliniai fermentai išlaiko funkcinį ir struktūrinį integralumą agresyviose aplinkose, net jei neatliktas susiuvimas. Nors labiau priimtina išpildyme kristalai yra susiuvami, skersinių jungčių sudarymas ne visada būtinas, kad pagamintume naudingą fermentinį kristalą pagal šį būdą.

Fermentiniai CLEC turi keletą svarbių charakteristikų, kurios jiems suteikia reikšmingą pranašumą lyginant su šiuo metu vartojamais tradiciniais fermentų imobilizavimo būdais. Fermentiniams CLEC nereikia atskiros inertinės nešančiosios struktūros. Be inertinio nešiklio pagerėja substrato ir produkto difuzija CLEC viduje ir galima kristale gauti fermento koncentraciją, artimą teorinei tokio dydžio molekulių supakavimo ribai. Aukštos fermento koncentracijos gali

duoti žymią gamybinę ekonomiją, dėka efektyvio aktyvumo išaugimo duotame katalizatoriaus tūryje, substrato ir fermento kontaktavimo laiko sutrumpėjimo ir bendro gamyklos dydžio bei kapitalinių idėjų sumažėjimo (Daniels, M.J., Methods in Enzymol. 136: 371-379 (1987)). Tolygus pasiskirstymas kristalo tūryje ir padidintas CLEC sudarančių fermentų stabilumas sukuria naujas galimybes fermentinės katalizės panaudojimui agresyviose aplinkose, tokiose kaip aukštos temperatūros, vandeniniai, organiniai ar beveik bevandeniai tirpikliai, o taip pat jų mišiniai. Be to, apribotas tirpiklio priėjimas ir taisyklinga baltymų aplinka, kuri būdinga kristalinei gardelei, leidžia fermentiniams CLEC geriau išlaikyti metalo jonus ir kofaktorius, palyginus su tradicinėmis fermentų imobilizavimo sistemomis.

Trumpas figūrų aprašymas

20 Fig. 1 grafiškai pavaizduoti tirpaus termolizino ir termolizino CLEC aktyvumų įvertinimo rezultatai.

Fig. 2 grafiškai pavaizduotas termolizino CLEC ir tirpaus termolizino priklausomybių nuo pH palyginimas.

Fig. 3 grafiškai pavaizduoti tirpaus ir kristalinio termolizino aktyvumo matavimai po inkubacijos prie 65°C.

30 Fig. 4 grafiškai pavaizduoti tirpaus termolizino ir termolizino CLEC atsparumo egzogeninei proteolitinei degradacijai įvertinimo rezultatai.

35 Fig. 5 grafiškai pavaizduoti tirpios elastazės ir atitinkamo elastazės CLEC fermentinių aktyvumų įvertinimo rezultatai.

- Fig. 6 grafiškai pavaizduoti tirpios elastazės ir atitinkamo elastazės CLEC atsparumai egzogeninei proteolitinei degradacijai.
- 5
- Fig. 7 grafiškai pavaizduoti tirpios esterazės ir atitinkamo esterazės CLEC fermentinių aktyvumų įvertinimo rezultatai.
- 10
- Fig. 8 grafiškai pavaizduoti tirpios esterazės ir atitinkamo esterazės CLEC atsparumai egzogeninei proteolitinei degradacijai.
- 15
- Fig. 9 grafiškai pavaizduoti tirpios lipazės ir atitinkamo lipazės CLEC fermentinių aktyvumų įvertinimo rezultatai.
- 20
- Fig. 10 grafiškai pavaizduoti tirpaus lizocimo ir atitinkamo lizocimo CLEC fermentinių aktyvumų įvertinimo rezultatai.
- 25
- Fig. 11 grafiškai pavaizduoti tirpios asparaginazės ir atitinkamo asparaginazės CLEC fermentinių aktyvumų įvertinimo rezultatai.
- 30
- Būtų labai naudinga, turėti paprastą ir bendrą būdą, užtikrinantį duoto fermento ar jų rinkinio stabilumą ir funkcionavimą prie sąlygų, kurios domina chemiką, užsiimantį sinteze, ir kurios yra per daug agresyvios, kad galėtų būti panaudoti šiuo metu žinomi fermentiniai būdai. Susiūti imobilizuoti fermentų kristalai (toliau sutrumpintai CLEC arba CLIFC), kaip čia aprašyta, gali būti panaudoti šiam tikslui. Kristalinės gardelės bei sudarančių kristalą fermentinių katalizatorių stabilizavimas, panaudojant skersinio susiuvimo reakciją, leidžia vartoti CLEC tokiose aplinkose, kaip vandeniniai, organiniai ar beveik bevandeniai
- 35

tirpikliai, šių tirpiklių mišiniai, kraštutinės pH reikšmės ir aukštos temperatūros, kurios nesuderinamos su fermentų funkcionavimu, naudojantis šiuo metu esamais būdais. Be to, CLEC kristalinės gardelės stabilizacija, leidžia jiems pritaikyti standartinius liofilizacijos būdus. Liofilizuoti CLEC gali būti išsaugomi be užšaldymo komerciškai priimtina laiko periodą (nuo mėnesių iki metų), o taip pat sudaro galimybę greitai ir paprastai panaudoti CLEC pramoninio ir laboratorinio masto procesuose, tiesiog sumaišant su pasirinktu tirpikliu be jokių tarpinių tirpiklio keitimų. Be to fermentiniai CLEC yra labai atsparūs egzogeninių proteazių poveikiui. Šio išradimo būdas palengvina lanksčių fermentinių katalizatorių panaudojimą pagrindiniuose pramoniniuose cheminiuose procesuose, o taip pat laboratorinėje sintezėje, ieškant naujų junginių.

Nors susiuvimas pagerina kristalinio fermento stabilumą, ne visais atvejais jis yra būtinas ir pageidautinas. Kai kurie kristaliniai fermentai išlaiko funkcinį ir struktūrinį integralumą agresyviose aplinkose ir be skersinių ryšių. Labiau priimtiname šio būdo išpildyme kristaliniai fermentai yra susiuvami, kaip smulkiai aprašyta tolesniuose skyriuose. Tačiau turi būti suprasta, jog kristalizuoti fermentai, nepraėję tolimesnės skersinio susiuvimo stadijos, gali būti panaudoti kai kuriuose šio išradimo išpildymuose.

Reguliarios sąveikos tarp CLEC kristalinę gardelę sudarančių fermentų molekulių apsprendžia riboto dydžio poras, vedančias prie fermento molekulių CLEC viduje. Todėl substratai, didesni už porų dydį, negali patekti į CLEC dalelių vidų.

35

Dėl riboto porų dydžio, daugelis fermentinių reakcijų, turinčių komercinę ir mokslinę reikšmę, bet susijusių

su substratais, didesniais nei CLEC porų dydis, turėtų likti už šio išradimo ribų. Tarp jų patektų daugumas reakcijų, susijusių su dideliais polimerais, tokiais kaip baltymai, polinukleotidai, polisacharidai ir kiti organiniai polimerai, kuriuose polimerinių subvienetų skaičius būtų toks, jog polimeras pasidarytų didesnis už CLEC kristalų porų dydį. Tačiau, tokiais atvejais, katalizė, vis dėlto, gali vykti CLEC paviršiuje.

Šis išradimas yra pasirinkto baltymo tame tarpe fermento imobilizavimo būdas, kristalizuojant ir susiuvant šį baltymą, to rezultate, gautas susiūtas imobilizuotas fermento kristalas (CLEC), gali būti panaudotas norimų produktų gamybos katalizavimui, tokių, kaip peptidai, angliavandeniai, lipidai ir chiralinės organinės molekulės. Be to šis išradimas susijęs su CLEC ir su pasirinkto produkto gamybos būdu, panaudojant CLEC katalizuojamą reakciją arba CLEC katalizuojamą žingsnį, tokių reakcijų sekoje. Viename iš šio išradimo išpildymų kondensacijos reakcijoje, katalizuojamoje susiūtu imobilizuotu termolizinu, gautu pagal šį būdą, buvo pagamintas dipeptidilinis aspartamo pirmtakas. Kitame šio išradimo išpildyme buvo skaldomas indikatorinis substratas, FAGLA, ir gauti kolorimetriškai produktai, kurių atsiradimas parodo termolizino CLEC fermentinį aktyvumą. FAGLA - hidrolizė buvo panaudota kaip modelinė reakcija, kad parodyti termolizino CLEC atsparumą visai eilei aplinkų, kurios paprastai būtų nesuderinamos su šio fermento aktyvumu.

Kituose šio išradimo išpildymuose fermentai elastazė, lipazė, asparaginazė ir lizocimas buvo panaudoti įvairių indikatorinių medžiagų skaldymui, tokių, kaip p-nitrofenilo acetatas (esterazė ir lipazė), sukcinil-(ala)3-p-nitroanilidas (elastazė), 4-metilumbeliferilo N-acetil-chitriozidas (lizocimas) ir NADH (asparaginazė).

Pasinaudodamas šio išradimo būdu, vidutinis šios srities specialistas gali pritaikyti protokolą reikalingo produkto gamybai, panaudojant reakciją, katalizuojamą imobilizuotu fermentu. Po to, kai 5 dominantis fermentas yra iškristalizuotas iš atitinkamo tirpalo, jis gali būti susiūtas su glutaraldehidu ar su kitu tinkamu bifunkciniu reagentu kristalizacijos tirpale, kad būtų gautas šio fermento CLEC. Vėliau, pasirinkto fermento CLEC gali būti liofilizuotas, kaip 10 aprašyta 2 pavyzdyje.

CLEC naudojimas turi keletą privalumų, lyginant su šiuo metu egzistuojančiais fermentinės katalizės būdais. Pavyzdžiui, susiūta kristalinė matrica yra pačio CLEC 15 nešiklis, todėl fermentinio katalizatoriaus surišimui nereikalingi brangūs nešikliai, rutuliukų, stiklo, gelių ar plėvelių pavidalo, kaip šiuo metu egzistuojančiuose fermentinės katalizės būduose. Todėl fermentų koncentracija fermentiniame CLEC yra artima 20 teorinei supakavimo ribai, kurią galima pasiekti tokio dydžio molekulėms, ir žymiai viršija tankį pasiekiamą net koncentruotuose tirpaluose. Visas CLEC sudarytas tik iš aktyvaus fermento (nėra neaktyvaus nešiklio), todėl turėtų būti minimizuotas, susietas su difuzija 25 fermentinės reakcijos greičio sumažėjimas, kuris paprastai stebimas tradiciškai imobilizuotuose fermentuose, lyginant su fermentais tirpale, kadangi CLEC atveju žymiai sutrumpėja (lyginant su tradiciškai imobilizuotų fermentų nešiklio dalelėmis) vidutinis 30 laisvas kelias, kurį turi nueiti substratas ir produktas tarp išorinio laisvo tirpiklio ir aktyvaus fermento. Šie dideli baltymų tankiai gali būti ypatingai naudingi biosensoriniuose, analitiniuose ar kituose pritaikymuose, kurie reikalauja didelių baltymų 35 kiekių mažuose tūriuose. Didesnis CLEC našumas ir kompaktiškumas pramoniniuose procesuose gali duoti reikšmingą gamybos ekonomiją, dėl padidinto katali-

zatoriaus efektyvinio aktyvumo duotame tūryje, kas leidžia sumažinti gamyklos dydį, o taip pat kapitalinius idėjimus (Daniels, M.J., Methods in Enzymol. 136: 371-379 (1987)). CLEC yra santykinai monodispersinis ir jo makroskopinis dydis bei forma atspindi atskiro fermentinio katalizatoriaus natūralaus kristalo augimo charakteristikas. Egzistuojančių terpių su fermentais, imobilizuotais nešikliuose, pakeitimas fermentiniais CLEC, turėtų būti nesudėtingas, kadangi abi sistemos yra panašaus dydžio ir formos ir abi gali būti panašiai išgautos iš žaliavos, panaudojant eilę paprastų būdų, tame tarpe panaudojant pagrindines ekonomiškąs procedūras tokias kaip filtravimą, centrifūgavimą, tirpiklių dekantavimą ir kitas.

15

Be to, naudojant liofilizuotus CLEC supaprastėja kasdienis elgesys su jais ir šių medžiagų saugojimas prieš jų pavartojimą (sausas saugojimas ilgesnį laikotarpį kambario temperatūroje be šaldymo). Liofilizuotus CLEC paprasta vartoti, nes prie jų galima tiesiogiai pridėti norimą tirpiklį ir substratą be ilgu tirpiklio keitimo procesų ir amorfinės suspensijos formavimo. Liofilizuota CLEC forma praplečia bendrą fermentų kaip katalizatorių panaudojimą, leisdamą panaudoti platesnį fermentų bei jų funkcionavimo sąlygų spektrą.

Antras CLEC privalumas yra tas, kad kristalizuoto fermento susiuvimas stabilizuoja ir sustiprina kristalinę gardelę ir ją sudarančias fermentų molekules tiek mechaniškai, tiek ir chemiškai. Todėl CLEC gali būti vienintelė priemonė pasiekti didelės aktyvaus fermentinio katalizatoriaus koncentracijas agresyviuose vandeniniuose, organiniuose, beveik bevandeniuose tirpikliuose ar vandens-organinių tirpiklių mišiniuose. Fermentinių katalizatorių panaudojimą organinėje sintezėje stabdė jų polinkis denatūruotis nevandeninių

35

tirpiklių aplinkoje, ypač vandeninių ir nevandeninių tirpiklių mišiniuose (Klibanov, A.M., Trends in Biochemical Sciences, 14: 141-144 (1989)). Fermentiniuose CLEC stabilumą apsprendžiantys konformacinio mobilumo apribojimai yra sąlygoti tarpmolekulinių kontaktų ir skersinių ryšių tarp kristalų gardelę sudarančių fermento molekulių, o ne beveik visiško vandens nebuvimo terpėje. Todėl, fermentai CLEC formoje gali toleruoti tarpines vandens koncentracijas, kas anksčiau buvo neįmanoma (žr. 12 lentelę). Komerciniuose taikymuose vandens-organinių tirpiklių mišiniai leidžia valdyti produktų formavimą, pasinaudojant produktų ir substratų santykiniu tirpumu. Cheminio reaktoriaus viduje net vandeninėje terpėje imobilizuoti ar tirpūs fermentiniai katalizatoriai yra veikiami mechaniškai, todėl jie gali denatūruotis arba gali sutrumpėti jų gyvenimo pusperiodis. Cheminiai skersiniai ryšiai CLEC viduje suteikia būtina mechaninį stiprumą (Quiocho ir Richards, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 52: 833-839 (1964)), kurio dėka pailgėja fermentinių katalizatorių išgyvenimas reaktoriuje.

Trečias CLEC privalumas yra sąlygotas jų kristalinės kilmės, dėl kurios galima pasiekti tolygumą visame susiūto kristalo tūryje. Kaip čia aprašyta, kristaliniai fermentai yra auginami ir susiuvami vandeninėje aplinkoje ir todėl molekulių išsidėstymas kristalinėje gardelėje išlieka tolygus ir taisyklingas. Šis tolygumas yra palaikomas tarpmolekulinių kontaktų ir cheminių skersinių ryšių tarp kristalinę gardelę sudarančių fermento molekulių ir išlieka perkėlus į kitą vandeninę, organinę ar beveik bevandenę terpę ar maišytus vandens-organinius tirpiklius. Visuose šiuose tirpikliuose fermento molekulės išlaiko pastovų tarpusavio atstumą, suformuodamos gerai apibrėžtas stabilias poras CLEC viduje, kurios palengvina substrato priėjimą prie fermentinio katalizatoriaus, o

taip pat produkto pašalinimą. Fermento aktyvumo tolygumas yra labai svarbus pramoniniuose, mediciniuose ir analitiniuose taikymuose, kuriuose pasikartojamumas ir stabilumas turi pirmąją svarbą.

5

Ketvirtas CLEC privalumas yra tas, kad kristalinėje formoje fermentai gali turėti ilgesnį darbo ir saugojimo pusperiodį. Kaip žinoma, gardelės sąveikos, net ir be skersinių jungčių, stabilizuoja baltymus, dalinai dėl to, kad apriboja konformacinius laisvės laipsnius, reikalingus baltymo denatūracijai. CLEC gardelinės sąveikos, fiksuotos cheminiais skersiniais ryšiais, ypač, vandeningų ir nevandeningų tirpiklių apribojimui, ypač, vandeningų ir nevandeningų tirpiklių mišiniuose (Klibanov, A.M., Trends in Biochemical Sciences, 14: 141-144 (1989)). Fermentai, kurie išbuvo kristalinėje būsenoje mėnesius ar metus, paprastai išlaiko didelį procentą savo katalitinio aktyvumo. Susiūti imobilizuotų fermentų kristalai saugoti bevandeniuose tirpikliuose būtų dar labiau apginti nuo mikrobinio užterštumo ir pažeidimo, kas sudaro rimtą problemą saugant didelius kiekius baltymų turtingoje maistinėmis medžiagomis vandeningoje terpėje. Liofilizuotų CLEC atveju, imobilizuoti fermentai saugomi be tirpiklio. Tai ir susiuvimo pagalba pasiekta stabilizacija, leidžia ilgalaikį CLEC saugojimą be šaldymo.

15

Penktas CLEC privalumas yra tas, kad dėl kristalinės gardelės stabilizavimo skersinėmis jungtimis jie gali turėti padidintą temperatūrinį atsparumą. Reakcijos vykdymas aukštesnėje temperatūroje negu tradiciniuose būduose gali padidinti dominančių reakcijų greitį tiek termodinamiškai, tiek ir pagerinant difuzijos greitį ir iš CLEC kristalinės gardelės. Šių efektų visuma 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995

35

duotam fermentinio katalizatoriaus kiekiui, kuris bendru atveju yra brangiausia reakcijos proceso sudedamoji dalis (Daniels, M.J., Methods in Enzymol. 136: 371-379 (1987)). CLEC temperatūrinis stabilumas yra išskirtinis, kadangi daugumas fermentinių sistemų reikalauja švelnių reakcijos sąlygų. CLEC taip pat turėtų būti atsparūs denatūracijai, sąlygotai laikino temperatūros pakilimo saugojimo metu.

10 Paskutinis CLEC privalumas susijęs su taisyklingos formos ir dydžio poromis tarp fermento molekulių jo kristalinėje gardelėje. Šis tirpiklio priėjimo apribojimas stipriai pagerina metalo jonų ir kofaktorių išlaikymą CLEC kristaluose, lyginant su tradiciškai imobilizuotais fermentais ir fermentais tirpaluose. Ši CLEC savybė duotų galimybę panaudoti ekonomiškai labiau apsimokančius nenutrūkstančio srauto procesus tose situacijose (žr. pvz., Oyama ir kt. Methods in Enzymol. 136: 503-516 (1987)), kuriuose, kitu atveju, fermentai būtų inaktyvuoti dėl metalo jonų arba kofaktorių išplovimo. Pavyzdžiui, kaip žinoma dipeptidilinio aspartamo pirmtako Z-L-Asp-L-Phe-OMe sintezėje, dalyvaujant termoliziniui, tradiciniais būdais imobilizuotas fermentas praranda savo katalitinį aktyvumą nenutrūkstamo srauto procesuose, iš dalies dėl kalcio jonų, svarbių termolizino aktyvumui, išplovimo. Praktiškai kalcio jonų išplovimas verčia naudoti mažiau efektyvius ciklinius procesus (Nakanishi ir t., Biotechnology 3: 459-464 (1985)). Išplovimas įvyksta kada susiformuoja kalcio jonų kompleksai su substratu Z-L-Asp, konkuruojantys su natūraliais kalcio surišimo saitais fermento paviršiuje, dėl ko ir prarandamas katalitinis aktyvumas. Didelis fermentų tankis ir atitinkamai ribotas tūris prieinamas tirpikliui CLEC tarpsluoksniuose, trukdo susidaryti kontroliuojantiems L-Asp-Ca⁺⁺ kompleksams, kurie atsakingi už metalo jonų išplovimą.

CLEC gavimas - fermentų kristalizacija

Šio išradimo būde susiūtas imobilizuotas fermento
5 kristalas (arba CLEC) gaunamas sekančiais:

Fermentiniai kristalai auginami kontroliuojant fermento
nusodinimą iš vandeninio tirpalo arba vandeninio
10 tirpalo su organiniais tirpikliais. Tarp sąlygų, kurios
turi būti kontroliuojamos, yra, pavyzdžiui, tirpiklio
išgarinimo greitis, pridėjimas į tirpalą atitinkamų
ištirpusių medžiagų ir buferių ir pH bei temperatūra.
Išsami įvairių faktorių, veikiančių baltymų
kristalizaciją, apžvalga buvo išspausdinta McPherson
15 (Methods Enzymol. 114: 112 (1985)). Be to, tiek
McPherson tiek ir Gilliland (J. Crystal Growth 90: 51-
59 (1988)) suformavo išsamų sąrašą visų baltymų bei
nukleotidinių rūgščių, kurios buvo kristalizuotos, taip
pat sąlygas, prie kurių vyko jų kristalizacija.
20 Kristalų bei kristalizacijos receptų rinkinys, o taip
pat duomenų saugykla apie tirpių baltymų ir
nukleotidinių rūgščių kristalų struktūras yra palaikomi
Baltymų Duomenų Banke (Protein Data Bank) (Bernstein ir
kt. J. Mol. Biol. 112: 535-542 (1977)) nacionalinėje
25 Brookhaven laboratorijoje. Šie šaltiniai gali būti
panaudoti nustatymui būtinų kristalizacijos sąlygų
tiems baltymams ir fermentams, kurie anksčiau buvo
kristalizuoti, prieš pradėdant formuoti atitinkamus
CLEC arba jais galima vadovautis, formuojant
30 kristalizacijos strategiją tiems baltymams, kurie prieš
tai nebuvo kristalizuoti. Kita galimybė, tai
intelektuali bandymų ir klaidų paieškos strategija
(žiūr. pvz., Carter, C.W. Jr. and Carter, C.W.,
J. Biol. Chem. 254: 12219-12223 (1979)), kuri daugeliu
35 atvejų duoda priimtinas kristalizacijos sąlygas
daugumai baltymų, tame tarpe, bet ne tik jiems, kurie
buvo aptarti aukščiau, jeigu gali būti pasiektas

priimtinas šių baltymų švarumo lygis. Reikalingas švarumo lygis nuo baltymo prie baltymo gali kisti plačiose ribose. Pavyzdžiui, lizocimo atveju fermentas buvo kristalizuotas iš jo nevalyto šaltinio - vištos kiaušinio baltymo (Gilliland, G.L., J. Crystal Growth 90: 51-59 (1988)).

Kad galėtų būti panaudoti kaip CLEC pagal šio išradimo būdą, fermentiniai kristalai neturi būti tokie dideli, kaip naudojami rentgeninėje difrakcinėje analizėje ir faktiškai tokie kristalai yra nepageidautini dėl difuzinių problemų, surištu su jų dydžiu. Mikrokristalinė medžiaga (t.y. kristalai 10^{-1} mm dydžio/skersinio pjūvio) gali būti naudojama kaip CLEC ir dažnai aptinkama, nors retai aprašoma rentgeninės kristalografijos literatūroje. Mikrokristalai labai naudingi šio išradimo būde, nes leidžia sumažinti iki minimumo problemas, susijusias su difuzija (žr. pvz., Quiocho, F.A., and Richards, F.M., Biochemistry 5: 4062-4076 (1967)).

Aplamai, kristalai gaunami maišant baltymus, kurie turi būti kristalizuoti, su atitinkamu vandeniniu tirpikliu arba vandeniniu tirpikliu, turinčiu reikalingą nusodinimo agentą, tokį kaip druskos ar organinės medžiagos. Tirpiklis sumaišomas su baltymu prie eksperimentiškai nustatomos temperatūros, kuri tinka kristalizacijos indukavimui bei leidžia baltymams išlaikyti jų stabilumą ir aktyvumą. Esant reikalui, tirpiklis gali turėti papildomų tirpių medžiagų, tokių kaip divalenčiai katijonai, kofaktoriai ar chaotropai, o taip pat buferines medžiagas pH kontrolei. Ar reikia papildomų ištirpusių medžiagų ir turi būti jų koncentracijos tam kad pagerintų kristalizaciją, nustato eksperimentiškai. Plataus masto pramoniniuose procesuose, kristalizaciją per kontroliuojamą nusodinimą geriausia atlikti paprasčiausiai maišant

baltymus, nusodintoją, papildomas ištirpintas medžiagas ir, esant būtinybei, buferius cikliniame procese. Taip pat galima pritaikyti alternatyvius laboratorinius kristalizacijos būdus, tokius kaip dializė ar garų difuzija. McPherson (Methods Enzymol. 114: 112 (1985)) ir Gilliland (J. Crystal Growth 90: 51-59 (1988)) savo kristalizacijos literatūros apžvalgose yra įtraukę išsamų tinkamų sąlygų sąrašą. Retkarčiais nesuderinamumas tarp susiuvančio reagento ir kristalizacijos terpės gali pareikalauti perkelti kristalus į labiau tinkamą tirpiklį.

Daugumas baltymų, kurių kristalizacijos sąlygos jau aprašytos literatūroje, jau sukaupe žymų potencialą kaip praktiniai fermentiniai katalizatoriai pramoniniuose ir laboratoriniuose cheminiuose procesuose, ir iš jų tiesiogiai galima suformuoti CLEC pagal šio išradimo būdą. 1 lentelėje pateikti fermentų pavyzdžiai, kurie buvo kristalizuoti anksčiau. Reikia pažymėti, kad sąlygos, pateiktos šiose nuorodose, buvo optimizuotos didelių difrakcinės kokybės kristalų auginimui, dažnai pridendant milžiniškas pastangas. Mažesniems kristalams, naudojamiems CLEC sudaryme, kai kuriais atvejais gali tekti šiek tiek paderinti kristalizacijos sąlygas.

1 lentelė

Fermentai	Mikrobinis ar biologinis šaltinis	Literatūra (tame tarpe ir čia cituota)
alkoholdehidrogenazė	arklio kepenys	Eklund ir kt., J. Mol. Biol. 146: 561-587 (1981)
alkoholoksidazė	<i>Pichia pastoris</i>	Boys ir kt., J. Mol. Biol. 208: 211-212 (1989) Tykarska ir kt., J. Protein Chem. 9: 83-86 (1990)
aldolazė (fruktozės-bifosfatazė)	triušio raumuo veršiuko raumuo žmogaus raumuo <i>Drosophila melanogaster</i>	Eagles ir kt., J. Mol. Biol. 45: 533-544 (1969) Heidmer ir kt., Science 171: 677-680 (1971) Goryunov ir kt., Biofizika 14: 1116-1117 (1969) Millar ir kt., Trans. Roy. Soc. Lond. B293: 209-214 (1981) Brenner ir kt., J. Biol. Chem. 257: 11747-11749 (1982)
aldolazė (PKDG)	<i>Pseudomonas putida</i>	Vandlen ir kt., J. Biol. Chem. 248: 2251-2253 (1973)
šarminė fosfatazė	<i>Escherichia coli</i>	Sowadski ir kt., J. Mol. Biol. 150: 245-272 (1981)
asparaginazė	<i>Erwinia carotova</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Proteus vulgaris</i>	North ir kt., Nature 224: 594-595 (1969) Epp ir kt., Eur. J. Biochem. 20: 432-437 (1971) Yoney ir kt., J. Mol. Biol. 110: 179-186 (1977) Tetsuya ir kt., J. Biol. Chem. 248: 7620-7621 (1972)
karboanhidrazė	žmogaus eritrocitas (C)	Kannan ir kt., J. Mol. Biol. 12: 740-760 (1965)

1 lentelė, tęsinys

Fermentai	Mikrobinis ar biologinis šaltinis	Literatūra (tame tarpe ir čia cituota)
	žmogaus eritrocitas (B) jaučio eritrocitas	Kannan ir kt., J. Mol. Biol. 63: 601-604 (1972) Carlsson ir kt., J. Mol. Biol. 80: 373-375 (1973)
katalazė	arklio eritrocitas <i>Micrococcus luteus</i> <i>Penicillium vitale</i> jaučio kepenys	Glauser ir kt., Acta Cryst. J. 21: 175-177 (1966) Marie ir kt., J. Mol. Biol. 129: 175-676 (1979) Vainshtein ir kt., Acta Cryst. A 37: C29 (1981) Eventoff ir kt., J. Mol. Biol. 103: 799-801 (1976)
kreatinkinazė	jaučio širdis triušio raumuo	Gilliland ir kt., J. Mol. Biol. 170: 791-793 (1983) McPherson, J. Mol. Biol. 61: 83-86 (1973)
glutaminazė	<i>Actenobacter glutanimasificans</i> <i>Pseudomonas 7A</i>	Wlodawer ir kt., J. Mol. Biol. 99: 295-299 (1975) Wlodawer ir kt., J. Mol. Biol. 112: 515-519 (1977)
gliukozės oksidazė	<i>Aspergillus niger</i>	Kalisz ir kt., J. Mol. Biol. 213: 207-209 (1990)
β-laktamazės	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Bacillus cereus</i>	Moult ir kt., Biochem J. 225: 167-176 (1986) Sutton ir kt., Biochem J. 248: 181-188 (1987)
laktatdehidrogenazė	kiaulės viščiuko ryklis	Hackert ir kt., J. Mol. Biol. 78: 665-673 (1973) Pickles ir kt., J. Mol. Biol. 9: 598-600 (1964) Adams ir kt., J. Mol. Biol. 41: 159-188 (1969)

1 lentelė, tęsinys

Fermentai	Mikrobinis ar biologinis šaltinis	Literatūra (tame tarpe ir čia cituota)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Schar ir kt., J. Mol. Biol. 154: 349-353 (1982)
lipazė	<i>Geotrichum candidum</i> arklio kasos liauka <i>Mucor meihei</i> žmogaus kasos liauka	Hata ir kt., J. Biochem. 86: 1821-1827 (1979) Lombardo ir kt., J. Mol. Biol. 205: 259-261 (1989) Brady ir kt., Nature 343: 767-770 (1990) Winkler ir kt., Nature 343: 771-774 (1990)
liuciferazė	skraidantis jonvabalis	Green, A.A., ir kt., Biochem. Biophys. Acta. 20: 170 (1956)
liuciferazė	<i>Vibrio harveyii</i>	Swanson ir kt., J. Biol. Chem. 260: 1287-1289 (1985)
nitrilhidratazė	<i>Brevibacterium P312</i> <i>P. chlororaphis B23</i>	Nagasawa ir kt., Biochem. Biophys. Res. Comm. 139: 1305-1312 (1986) Nagasawa ir kt., Eur. J. Biochem. 162: 691-698 (1987)
peroksidazė	krienas krieno šaknys (E4 tipas) japoniškas krienas	Braithwaite ir kt., J. Mol. Biol. 106: 229-230 (1976) Aibara ir kt., J. Biochem. 90: 489-496 (1981) Morita, Acta Cryst. A28: S52 (1979)
peroksidazė (chlorido)	<i>Caldaromyces fumago</i>	Rubin ir kt., J. Biol. Chem. 257: 7768-7769 (1982)
peroksidazė (citochromo)	<i>Sarchomyces cerevisiae</i>	Poulos ir kt., J. Biol. Chem. 253: 3730-3735 (1978)
peroksidazė (glutationo)	jaučio eritrocitas	Ladenstein ir kt., J. Mol. Biol. 104: 877-882 (1979)

1 lentelė, tęsinys

Fermentai	Mikrobinis ar biologinis šaltinis	Literatūra (tame tarpe ir čia cituota)
subtilizinas	<i>Bacillus subtilis</i> (Novo) <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> (BPN') <i>Bacillus subtilis</i> (Carlsberg)	Drenth ir kt., J. Mol. Biol. 28: 543-544 (1967) Wright ir kt., Nature 221: 235-242 (1969) Petsko ir kt., J. Mol. Biol. 106: 453-456 (1976)
superoksido dismutazė	jaučio špinatų <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Escherichia coli</i> <i>Bacillus stearothermophilus</i> <i>Pseudomonas ovalis</i>	Richardson ir kt., J. Biol. Chem. 247: 6368-6369 (1972) Morita ir kt., J. Mol. Biol. 86: 685-686 (1974) Beem ir kt., J. Mol. Biol. 105: 327-332 (1976) Bridgen ir kt., J. Mol. Biol. 105: 333-335 (1976) Yamakura ir kt., J. Biol. Chem. 251: 4792-4793 (1976)
termolizinas	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>	Matthews ir kt., Nature New Biol. 238: 37-41 (1972)
ureazė	kanavaliija (<i>Canavalia ensiformis</i>)	Summer J.B., J. Biol. Chem. 69: 435 (1926)
ksilozės izomerazė	<i>Streptomyces rubiginosus</i> <i>Arthrobacter B3728</i> <i>Streptomyces olivochromogenes</i> <i>Streptomyces violaceoniger</i> <i>Actinoplanes missouriensis</i>	Carrell ir kt., J. Biol. Chem. 259: 3230-3236 (1984) Akins ir kt., Biochym. Biophys Acta 874: 375-377 (1986) Farber ir kt., Protein Engineering 1: 459-466 (1987) Glasfeld ir kt., J. Biol. Chem. 263: 14612-14613 (1988) Rey ir kt., Proteins: Struc. Func. Genet. 4: 165-172 (1988)

CLEC gavimas - skersinio susiuvimo reakcija

Po to, kai kristalai išauginti tinkamoje terpėje, juos galima susiūti. Skersinis susiuvimas stabilizuoja kristalinę gardelę, įvedamas kovalentines jungtis tarp kristalą sudarančių fermento molekulių. Tai sudaro galimybes perkelti fermentą į kitą reakcinę terpę, kuri kitaip gali būti nesuderinama su kristalinės gardelės ar net su intaktnio nedenatūruoto baltymo egzistavimu. Susiuvimą galima atlikti įvairiausių bifunkcinių reagentų pagalba, nors praktiškai dažniausiai vartojamas pigus ir paprastas glutaraldehydas. (Kitų galimų susiuvimo reagentų sąrašą galima rasti, pavyzdžiui, 1990 m. Pierce Chemocal Company kataloge).

Skersinis susiuvimas su glutaraldehydu suformuoja stiprius kovalentinius ryšius pirmiausia tarp lizino amino rūgšties liekanų pačioje fermento molekulėje ir tarp fermento molekulių, sudarančių kristalą. Susiuvimo sąryšiai neleidžia kristalą sudarančioms fermento molekulėms grįžti į tirpalą, efektyviai padaro netirpiomis arba imobilizuoja fermento molekules į mikrokristalines (idealiu atveju 10^{-1} mm) daleles. Po to makroskopiniai, imobilizuoti, netirpūs kristalai gali būti lengvai atskiriami nuo produkto ir nesureagavusio substrato, esančių žaliavoje, paprastų procedūrų, tokių kaip filtravimas, dekantavimas ir kt., pagalba. Juos taip pat galima panaudoti nenutrūkstančio srauto procesų kolonose, užpildomose fermentiniu CLEC, kuriose jis pasižymi geresniu kofaktorių ir metalo jonų išlaikymu.

Pagal šio išradimo būdą fermentiniai CLEC daromi kaip fermentiniai katalizatoriai, kurie gali veikti egzistuojančiose ir naujose aplinkose. Padidintas CLEC stabilumas, kuri nulemia skersinio susiuvimo reakcija, leidžia juos perkelti į tirpiklius (pvz., vandeninius,

organinius ar beveik bevandenius tirpiklius arba jų mišinius), su kuriais, kitu atveju, fermentinis CLEC būtų nesuderinamas, ir leidžia vykdyti operacijas cheminiuose reaktoriuose su pakelta temperatūra ir ekstremaliais pH. Makroskopinėmis katalizuojančiomis CLEC dalelėmis lengva manipuliuoti, nes jas galima išgauti iš žaliavos tokiais paprastais būdais, kaip filtravimas, centrifūgavimas arba dekantavimas iš tirpiklio. Be to, jas galima naudoti nenutrūkstamo srauto procesų kolonose.

CLEC gavimas-liofilizacija

Vienas tūris susiūtų termolizino kristalų suspensijos buvo liofilizuojamas per naktį dešimtyje tūrių demineralizuoto vandens, esant pH 7,0, panaudojant liofilizatorių VirTis Modelis #24. Liofilizuoti kristalai buvo atstatomi pridėdant dešimt tūrių pasirinkto tirpiklio tiesiai prie kristalų, kurie prieš tai buvo laikomi kambario arba 4°C temperatūroje. FAGLA skaldymo eksperimentams, rehidratuoti kristalai buvo atstatomi 10 mM kalcio acetato buferyje, prie pH 7. Atstatyti liofilizuoti CLEC paprastai buvo saugomi kambario temperatūroje. Palyginimui, kad tirpus fermentas išlaikytų specifinį aktyvumą ilgiau nei savaitę, jį reikia laikyti prie -70°C. Tokia saugojimo ir apdorojimo tvarka buvo pritaikyta fermentams, aprašytiems čia pateiktuose pavyzdžiuose.

30 Aspartamo pirmtako sintezė termolizino CLEC pagalba

Šio išradimo būdas, pagal kurį gaminami susiūti kristaliniai fermentai, aprašytas žemiau ir pailiustruotas gamyba termolizino susiūtų imobilizuotų fermentinių kristalų, naudojamų aspartamo dipeptidilinio pirmtako gavimui etilo acetate, kuris yra beveik bevandenis organinis tirpiklis. Termolizinas jau buvo

kristalizuotas ir jo struktūra išaiškinta iki 1,6Å skiriamosios gebos (Holmes and Matthews, J. Mol. Biol. 160: 623-639 (1982)), ir yra vienas iš fermentų, kuri galima naudoti kaip CLEC pagal šį būdą. Termolizinas naudojamas dirbtinio saldintojo aspartamo gamyboje (Isowa ir kt. U.S. Patent #4436925 (1984); Lindeberg, J. Chem. Ed. 64: 1062-1064 (1987); Nakanishi ir kt., Biotechnology 3: 459-464 (1985); Oyama, ir kt., Methods in Enzymol. 136: 503-516 (1987)). Pasirodo, didžioji dalis aspartamo šiuo metu gaminama tradiciniais sintetinės chemijos būdais, nors tradiciškai imobilizuoto termolizino panaudojimas beveik benvandenėje terpėje davė skatinančius rezultatus (Oyama ir kt., J. Org. Chem. 46: 5242-5244 (1981); Nakanishi ir kt., Biotechnology 3: 459-464 (1985)). Pagerintas, panaudojant šio išradimo būdą, aspartamo fermentinis gamybos būdas galėtų konkuruoti su šiuo metu naudojamais gamybos būdais tiek patogumo, tiek ir kainos požiūriu (Oyama, ir kt., Methods in Enzymol. 136: 503-516 (1987)).

Termolizino CLEC įvertinimas

Šio išradimo būdas buvo panaudotas termolizino CLEC gamyboje, ir buvo įvertinti gautų termolizino CLEC stabilumas ir priklausomybė nuo pH, stabilumas prie pakeltų temperatūrų, atsparumas egzogeninei proteolizei ir stabilumas organiniuose tirpikliuose. Termolizino CLEC palyginimas su tirpiu termolizinu smulkiau aprašytas 2 pavyzdyje ir 1-4 pav. Įvertinimo rezultatai parodė:

1. Kas dėl priklausomybės ir stabilumo nuo pH, tai abi formos rodė maksimalų aktyvumą prie pH 7 ir turėjo panašų aktyvumą rūgštiniame diapazone. Šarminiame diapazone termolizino CLEC išlaikė maksimalų aktyvumą iki pH 10; tirpus termolizinas

prie pH 8,5 turėjo 75% aktyvumo, prie pH 9 - 25% aktyvumo ir prie pH 9,5 buvo visiškai neaktyvus.

5 2. Papildomas stabilumas, gaunamas fermentiniuose
CLEC, leidžia jiems išlaikyti fermentinį aktyvumą
prie aukštesnių temperatūrų, nei tai įmanoma
tirpaus termolizino atveju. Padidintas termolizino
CLEC stabilumas prie žemesnių temperatūrų
10 supaprastina jų saugojimą, lyginant su tirpiu
fermentu. Termolizino CLEC, taip pat, parodė
terminį stabilumą ir atsparumą autolizei, nes
išlaikė maksimalų aktyvumą po 5 dienų inkubacijos
prie 65⁰C. Priešingai, tirpus termolizinas prarado
50% savo pradinio aktyvumo po 2 valandų
15 inkubacijos ir parodė vos pastebimą aktyvumą po
24 valandų inkubacijos prie 65⁰C.

20 3. Fermentinis termolizino CLEC aktyvumas nepakito po
4 dienų inkubacijos galingos streptokokinės
proteazės, Pronase[®], aplinkoje. Priešingai, tirpus
termolizinas greitai degradavo ir prarado visą
aktyvumą po 90 minučių inkubacijos.

25 4. Kaip matosi iš 12 lentelės, termolizino CLEC ir
tirpaus termolizino stabilumas organinių tirpiklių
aplinkoje stipriai skyrėsi. Termolizino CLEC
išlaikė daugiau kaip 95% maksimalaus aktyvumo po
inkubacijos visuose tirtuose organiniuose
tirpikliuose.

30 Dėl šių savybių, termolizino ir kitų fermentų CLEC yra
ypač naudingi, kadangi juos lengviau saugoti, jie yra
stabilesni ir sunkiau inaktyvuojasi ar degraduoja nei
atitinkami tirpūs fermentai.

Elastazės CLEC įvertinimas

Šio išradimo būdas taip pat buvo panaudotas elastazės CLEC gamybai, buvo įvertintas gautų elastazės CLEC aktyvumas ir atsparumas egzogeninei proteolizei. Elastazės CLEC palyginimas su tirpia elastaze smulkiau aprašytas 3 pavyzdyje ir 5-6 pav. Įvertinimo rezultatai parodė:

- 10 1. Elastazės CLEC išlaikė apie 50% aktyvumo, lyginant su tirpiu fermentu.
- 15 2. Tirpi elastazė greitai degradavo proteazės poveikyje. Tirpios elastazės aktyvumas sumažėjo iki 50% pradinio aktyvumo po 10 minučių inkubacijos su proteaze. Po 1 val. inkubacijos tirpus fermentas prarado daugiau nei 90% savo aktyvumo. Priešingai, elastazės CLEC fermentinis aktyvumas nepakito po inkubacijos proteazės aplinkoje.
- 20

Esterazės CLEC įvertinimas

Šio išradimo būdas buvo panaudotas esterazės CLEC gamybai, buvo įvertintas gautų esterazės CLEC aktyvumas bei atsparumas egzogeninei proteolizei. Esterazės CLEC palyginimas su tirpia esteraze smulkiau aprašytas 4 pavyzdyje ir 7-8 pav. Įvertinimo rezultatai parodė:

- 30 1. Esterazės CLEC išlaikė apie 50% aktyvumo, lyginant su tirpiu fermentu.
- 35 2. Tirpi esterazė buvo labai jautri proteolitinei degradacijai. Tirpios esterazės aktyvumas sumažėjo iki 50% pradinio aktyvumo po 10 minučių inkubacijos proteazės aplinkoje. Po 1 val. inkubacijos tirpus fermentas prarado daugiau nei

90% savo aktyvumo. Priešingai, esterazės CLEC fermentinis aktyvumas nepakito po inkubacijos proteazės aplinkoje.

5 Lipazės CLEC įvertinimas

Šio išradimo būdas buvo panaudotas lipazės CLEC gamybai, ir buvo įvertintas gautų lipazės CLEC aktyvumas. Lipazės CLEC palyginimas su tirpia lipaze smulčiau aprašytas 5 pavyzdyje ir 9 pav. Įvertinimo rezultatai parodė, kad lipazės CLEC išlaiko apie 90% aktyvumo lyginant su tirpiu fermentu.

Lizocimo CLEC įvertinimas

Šio išradimo būdas buvo panaudotas lizocimo CLEC gamybai ir buvo įvertintas gautų lizocimo CLEC aktyvumas ir atsparumas egzogeninei proteolizei. Lizocimo CLEC palyginimas su tirpiu lizocimu smulčiau aprašytas 6 pavyzdyje ir 10 pav. Įvertinimo rezultatai parodė, kad lizocimo CLEC išlaiko apie 50% aktyvumo lyginant su tirpiu fermentu.

Asparaginazės CLEC įvertinimas

Šio išradimo būdas buvo panaudotas asparaginazės CLEC gamybai ir buvo įvertintas gautų asparaginazės CLEC aktyvumas. Asparaginazės CLEC palyginimas su tirpia asparaginaze smulčiau aprašytas 7 pavyzdyje ir 11 pav. Įvertinimo rezultatai parodė, kad asparaginazės CLEC išlaiko apie 77% aktyvumo lyginant su tirpiu fermentu.

Bendras CLEC panaudojimas

Kaip čia atskleista, CLEC atstovauja naujai technologijai, kuri gali būti plačiai taikoma daugelyje sričių, tame tarpe, bet ne tik jose, pramoninio masto

sintezėje, laboratorinėse metodikose, biosensoriuose, medicininuose pritaikymuose. 2-5 lentelėse pateikti pavyzdžiai įvairių sistemų, kurios savo veikloje naudojo tradiciniais būdais imobilizuotus fermentus.

5 Šios srities specialistas sugebėtų pritaikyti šias ir panašias sistemas prie CLEC technologijos, atskleistos šioje paraiškoje. Tam, kad tai pailiustruoti, konkretūs pavyzdžiai iš kiekvienos pateiktos kategorijos bus aptarti smulkiau.

10

2 lentelėje pateikti pavyzdžiai pramoninių procesų, kuriuose naudojami tradiciniais būdais imobilizuoti fermentai ir kuriuos lengvai galima adaptuoti čia aprašytai CLEC technologijai.

15

2 lentelė

Fermentai	Produkcija arba pritaikymas	Substratai	Literatūra (tame tarpe ir cituota)
termolizinas	aspartamo pirmtakas	Z-Asp, L-Phe-OMe	Oyama ir kt., J. Org. Chem. 46: 5242-5244 (1981) Nakanishi ir kt., Trends in Biotechnology 3: 459-464 (1985)
subtilizinas	aspartamas	L-Asp-L-Phe, OMe	Davino, A.A., US Patent 4293648 (1981)
lipazė	kokoso aliejaus pakaitalas	palmių aliejus	Harwood, J., Trends in Biochemical Sciences 14: 125-126 (1989) Macrae, A.R., J. Am. Oil Chem Soc. 60: 291-294 (1983)
nitrilhidratazė, nitrilazė, amidazė	akrilamidas	akrilonitrilas	Nagasawa, T. and Yamada, H., Trends in Biotechnology 7: 153-158 (1989)

2 lentelė, tęsinys

Fermentai	Produkcija arba pritaikymas	Substratai	Literatūra (tame tarpe ir cituota)
aminoaci-lazė (grybų) amino rūgščių esterazė, subtilizinas amidazės hidantio-nazės tam tikros dehidrogenazės	amino rūgščių atskyrimas	N-acil-D,L amino rūgštys D,L amino rūgščių esteriai D,L amino rūgščių amidai hidantoinai a-hidroksikarboksilinės rūgštys	Schmidt-Kastner, G. & Egerer, P. in Biotechnology vol 6a: 387-421 (1984) ir ten esančios nuorodos Fusee, M.C., Methods in Enzymology 136: 463 (1987)
amino peptidazė transaminazė amino rūgščių dehidrogenazė + formiatdehidrogenazė	amino rūgščių gamyba: bendra amino rūgščių gamyba: konkreiti	keto ir hidroksi rūgštys	Rozzell, J.D., Methods in Enzymology 136: 479 (1987) Enzymes in Industry; Ed Gerhartz, W., VCH Press 1990
L-aspartazė	L-asparagino rūgštis	fumaratai/ fumarinė rūgštis	
L-aspartat 4 dekarboksilazė aspartazė + L-aspartat 4	L-alanino rūgštis	L-asparagino rūgštis, amonio fumaratas	

2 lentelė, tęsinys

Fermentai	Produkcija arba pritaikymas	Substratai	Literatūra (tame tarpe ir cituota)
dekarboksilazė ACL hidrolazė L-ACT hidrolazė	L-lizinas L-cisteinas L-isooleucinas L-metioninas	D,L-a amino e-kaprolaktamas (ACL) D,L-2amino 2-tiazolin-4-karboksilinė rūgštis	
liazė L-triptofano sintetazė fumarazė hidantoinazė	L-fenilalaninas L-triptofanas L-valinas L- obuolių rūgštis D n karbamoil p-hidroksi-fenilo glicinas	cinamono rūgšties druskos indolas, L-serinas fumaratai 5p-hidroksi hidantoinas	
lipazės, esterazės	racematų atskyrimas naudojant stereoselektyvią sintezę	sintetiniai cheminiai junginiai	Jones, J.B., Tetrahedron 42: 3351-3403 (1988) Butt, S. and Roberts, S.M. Natural Product Reports 489-503 (1986), ir jame esančios nuorodos, išsamesnei šios srities apžvalgai.
fumarazė	L- obuolių rūgštis	fumaro rūgštis	Chibata ir kt., Methods in Enzymology 136: 455 (1987)

2 lentelė, tęsinys

Fermentai	Produkcija arba pritaikymas	Substratai	Literatūra (tame tarpe ir cituota)
laktazė, β-galakt- ozidazės	disacharidų sintezė, pvz.: galaktozil-N-acetilo galaktozaminas	laktozė & N-acetilo galaktozaminas	Larsson ir kt., Methods in Enzymology 136: 230 (1987)
lipazė, esterazė	L-mentolas	mišinys 4 izomerų	Fukui, S., Tanaka, A., Methods in Enzymology 136: 293 (1987)
amidazės	D-valinas (piretridinių insekticidų tarpininkas)	D,L amino rūgščių amidai	Schmidt-Kastner, G. & Egerer, P. in Biotechnology vol 6a: 387-421 (1984) ir ten esančios nuorodos
lipazė (<i>Candida cylindri- cea</i>)	R(+)2 fenoksi-propiono rūgštys (herbicidai)	2 chloro propiono rūgštys	Biocatalysts in Organic Synthesis ads Tramper, van de Plas & Linko; Proceedings of International Symposium in Netherlands 1985
lipazės, esterazės, amidazės, aldolazės, proteazės, peptidazės, mielių lipazė	organinė sintezė monogliceridai peptidai 2 (p-chlorofe-noksi) propiono rūgštis: herbicidas	atskyrimas raceminių esterių	Jones, J.B., Tetrahedron 42: 3351-3403 (1988) Butt, S. and Roberts, S.M. Natural Product Reports 489-503 (1986), ir jame esančios nuorodos, išsamesnei šios srities apžvalgai.
strikto- dinsinte- tazė	alkaloidų gamyba pvz. striktozidinas		Pfitzner ir kt., Methods in Enzymology 136: 342 (1987)

2 lentelė, tęsinys

Fermentai	Produkcija arba pritaikymas	Substratai	Literatūra (tame tarpe ir cituota)
penicilino acilazė penicilino amidazė	6-amino penicilinano rūgštis ir 7-ADCA	penicilinas G arba V	Enz Eng 6: 291 (1982) Enz Eng 8: 155
hidroksi-steroidų dehidrogenazė	steroidų transformacijos		Carrea ir kt., Methods in Enzymology 136: 150 (1987)
5' fosfo-diesterazė, nukleazės esterazė	5'-ribonukleotidai β-laktamo pirm-takas (chiraliniai mono esteriai, pvz. β amino glutaro rūgšties mono-alkilinis esteris)	atitinkami diesteriai	Keller ir kt., Methods in Enzymology 136: 517 (1987) Japonų patentinė paraiška: 82-159493 (1981) Biseibutsu Company
lipazės	β-blokatoriai		Kloosterman, M ir kt., Trends in Biotechnology 6: 251-256 (1988)

Akrilamido gamyba, panaudojant CLEC technologiją

5 Žemiau aprašytas venas iš šio išradimo būdo panaudo-
jimų: pritaikymas akrilamido gamybos, naudojančios
imobilizuotas ląsteles, kurios duoda fermento nitrilo
10 hidratazės perprodukciją (Nagasawa, T. and Yamada, H.,
Trends in Biotechnology 7: 153-158 (1989)), prie
anksčiau šiame aprašyme atskleistos CLEC technologijos.

Akrilamido, svarbaus ir plačiai vartojamo chemikalo, pramoninio masto gamybą aprašė Yamada ir bendradarbiai (Nagasawa, T. and Yamada, H., Trends in Biotechnology 7: 153-158 (1989)). Cheminiuose reaktoriuose, užpildomuose imobilizuotomis ląstelėmis, kurios parinktos kaip fermento nitrilo hidratazės perproduktoriai, per metus pagaminama tūkstančiai tonų akrilamido. Nitrilo hidratazė, kaip skelbta literatūroje, buvo išvalyta ir kristalizuota iš dviejų šaltinių, *Brevibacterium* R312 (Nagasawa et. al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 139: 1305-1312 (1986) ir *P. chlororaphis* B23 (Nagasawa et. al., Eur. J. Biochem. 162: 691-698 (1987)). Kaip čia atskleista, šie kristaliniai fermentai gali būti imobilizuoti, panaudojant susiuvimą su glutaraldehidu ar kitu tinkamu susiuvimui reagentu ir gauti jų CLEC. Po to, nitrilo hidratazės CLEC galima naudoti tradiciniuose reaktoriuose vietoj šiuo metu naudojamų imobilizuotų ląstelių. Šio proceso pritaikymas prie CLEC technologijos duoda tiesioginius privalumus. Tarp jų, sumažėjusį gamyklos dydį ir geresnę išėigą, dėka padidėjusio aktyvumo tūrio vienetė, dėl didesnės fermento koncentracijos CLEC viduje ir pagerinto substrato ir produkto difuzijos greičio; nepageidautino užteršimo ir šalutinių reakcijų sumažėjimą, dėl didesnio CLEC grynumo; ir mažesnę jautrumą mikrobiniam užteršimui, kadangi nėra ląstelių. Be to, yra ir kitų, tik fermentiniais CLEC pagrįstam būdui būdingų, privalumų. Tarp jų, aukštesnė darbo temperatūra, padidinanti reakcijos greitį; galimybės dirbti vandeniniuose, organiniuose ir beveik bevandeniuose tirpikliuose, kas leidžia optimizuoti akrilamido gamybos reakciją; ir ilgesnis darbo ir saugojimo pusperiodis, išplaukiantis iš didesnio cheminio ir mechaninio CLEC stabilumo, ypač netradiciniuose tirpikliuose.

**CLEC technologijos pritaikymai medicinoje - ekstra-
korporalinis gydymas**

Šio išradimo būdas ir atitinkamai parinktas CLEC ar jų
 5 rinkinys taip pat gali būti panaudotas medicininiuose
 taikymuose. Pavyzdžiui, CLEC arba CLEC rinkinys gali
 būti panaudotas komponento pašalinimui iš skysčio,
 tokio kaip kraujas, paprastai jį pakeičiant, tuo pačiu
 paverčiant jį į medžiagą, nežalingą pacientui, arba
 10 medžiagą, kurią gali pašalinti normalūs organizmo
 procesai (pvz., per detoksikaciją ar suskaidymą kepenyse
 ar išskyrimą per inkstus). Šiame pritaikyme, sudaromas
 kontaktas tarp atitinkamai parinkto fermentinio CLEC ar
 jų rinkinio ir audinių skysčio, turinčio komponentą,
 15 kuri reikia pakeisti, arba reakcijos, kurioje dalyvauja
 komponentas, reaktantą (produktų ar substratą), kuri
 veikia CLEC fermentas. To pasekoje, fermentas gali
 paveikti komponentą, kuri reikia pakeisti, arba kita
 medžiagą, esančią reakcijos, kurioje dalyvauja toks
 20 komponentas, produktu. Fermento aktyvumo dėka
 tiesiogiai pakeičiamas pats šalinamasis komponentas
 arba reakcijos, kurioje dalyvauja komponentas, produk-
 tas (tuo būdu sustabdomas tolimesnis reakcijos vyks-
 mas). Tai galima padaryti panaudojant ekstrakorporalinį
 25 (išorinį kūno atžvilgiu) prietaisą, kuriame yra
 specialiai parinktas CLEC ar jų rinkinys ir turintį
 priemones jų išlaikymui, kurios arba padarytos iš
 akytos medžiagos, išlaikančios CLEC, arba yra vamzdis,
 kuriame laikomi CLEC, ir kuris pasirūpina kontaktu tarp
 30 pačio norimo pakeisti komponento ar medžiagos, esančios
 reakcijos, kurioje toks komponentas dalyvauja,
 produktu.

Taip pat, tai galima atlikti, įvedant parinktą CLEC į
 35 tinkamą kūno ertmę, tokią kaip pilvaplėvę ar limfinį
 mazgą, kurioje CLEC gali susisiekti su audinių skysčiu.
 Šį įvedimą galima atlikti chirurginiu būdu arba

atliekant CLEC suspensijos injekciją. Tiesioginė CLEC injekcija į kraują nepriimtina dėl didžiulės embolijos (kraujagyslių užsikimšimo) rizikos.

- 5 Atitinkamų CLEC panaudojimas šioje srityje gali pakeisti genetinius būdus, naudojamus fermentų pakeitimo terapijoje, koreguojant įgimus nepakankamumus, tokius kaip fenilketonurija.
- 10 3 lentelėje pateiktos kai kurios medicininės situacijos, kuriose gali būti panaudoti CLEC. Daugumoje šių atvejų ekstrakorporalinis gydymas yra tikrai tyrimo stadijoje, bet pranašumai būdingi fermentiniams CLEC gali pateikti naujus gydymo būdus tokiose srityse, kuriose anksčiau nebuvo alternatyvaus gydymo.
- 15

3 lentelė

Naudojamas fermentas	Pašalinimas:	Gydoma liga/pacientai	Literatūra
asparaginasė	asparaginas	leukemija (pašalinant asparaginą, svarbią vėžiui maitinę medžiagą, pažeidžiamos leukeminės ląstelės, kurios nesugeba gaminti šios svarbios amino rūgšties; normalios ląstelės gali gaminti asparaginą ir todėl gydymo nepaveikiamos)	Klein, M., Langer, R., Trends in Biotechnology 4: 179-185 (1986) ir ten esančios nuorodos Chang, T.M.S., Methods in Enzymology 137: 444-457 (1987) ir ten esančios nuorodos
heparinasė	heparinas	hemoperfuzuojamų pacientų deheparinacija, pvz., inkstų dializė	Langer, R., ir kt., Science 217: 261-263 (1982)

3 lentelė, tęsinys

Naudojamas fermentas	Pašalinimas:	Gydoma liga/pacientai	Literatūra
bilirubino oksidazė	bilirubinas	naujagimių geltligė	Lavin, A., ir kt., Science 230: 543-545 (1985)
karboksi-peptidazė	metotreksatas	chemoterapijos pacientai	Pitt, A.M., ir kt. Appl. Biochem. Biotechnol. 8: 55-68 (1983)
tirozinazė	aromatinės amino rūgštys	kepenų sutrikimas, pasireiškiantis nesveiku amino rūgščių pagausėjimu	Chang, T.M.S., Sem. Liver Dis. Ser. 6: 148 (1986)
fenilalanino amonio liazė	fenilalaninas	fenilketonuria ir kepenų sutrikimas	Ambrus, C.M., ir kt., J. Pharm. & Exp. Ther. 224: 598-602 (1983)
multifermentinė sistema apjungianti: ureazę, glutamato dehidrogenazę, gliukozės dehidrogenazę & transaminazę	šlapalas (paverčiamas į glutamino ir kitas amino rūgštis, per amonį	detoksikacija pacientų su chronišku inkstų nepakankamumu	Chang, T.M.S., Methods in Enzymology 137: 444-457 (1987) ir ten esančios nuorodos Chang, T.M.S., Enzyme Eng 5: 225 (1980)
arginazė	argininas	paveldima hiperargininemia	Kanalias, J.J. ir kt., Biochem. Med. 27: 46-55 (1982)
glutamato dehidrogenazė & amonis	amonis	kepenų sutrikimai	Maugh, T.H., Science 223: 474-476 (1984)

Žemiau aprašytas konkretus šio būdo pritaikymas heparino liazės sistemoje, skirtoje heparino pašalinimui iš kraujo (Bernstein ir kt., *Methods in Enzymology* 137: 515-529 (1987)).

5

Kad išvengti kraujo sukrešėjimo, naudojant ekstrakorporalinius prietaisus per kuriuos teka kraujas, tokius kaip inkstų dializės, nepertraukiamo veikimo kraujo filtravimo prietaisai arba ekstrakorporaliniai mechaniniai membraniniai oksigenatoriai, būtinas heparino įvedimas pacientui. Tačiau, paciento heparinizacija sukelia hemoraginių komplikacijų ir sudaro pavojų žmogaus sveikatai. Šios problemos išauga ilgėjant perfuzijos laikui, pavyzdžiui membraninių oksigenatorių atveju, ir gali įvykti rimtas nukraujavimas. Po ekstrakorporalinės terapijos, hepariną galima pašalinti iš kraujo prietaisu, įtaisytu prie ekstrakorporalinio prietaiso išėjimo ir turinčiu heparinazės, kuris pašalina visą hepariną iš pacientui gražinamo kraujo ir tuo būdu išvengiama šiuo metu esančių heparinizacijos problemų.

Publikuotose tyrimuose (Langer ir kt., *Science* 217: 261-263 (1982); Bernstein ir kiti., *Methods in Enzymology* 137: 515-529 (1987)), smulkiai aprašytos problemos kylančios panaudojant tradiciniais būdais imobilizuotus fermentus ekstrakorporaliniuose įrenginiuose. Pagrindinė problema susijusi su blogu fermentinio aktyvumo tūrio vienetui išlaikymu naudojant tradicinius imobilizacijos būdus, dėl ko, tam, kad atlikti būtina heparinizaciją, reikalingas didelis imobilizuoto fermento tūris. Šis tūris yra per daug didelis, kad jį galima būtų naudoti praktiniame žmonių gydyme. Tačiau, didelis aktyvumas tūrio vienetu, kuris išlaikomas fermentiniuose CLEC, neturinčiuose inertinio nešiklio, apeina šią problemą ir pasiūlo praktinį žmogaus heparinizacijos problemos sprendimą. Padidintas

35

CLEC stabilumas sumažins fermentų disociaciją susiūtame kristale. Tuo jie yra pranašesni už mažiau stabilius tradiciniais būdais imobilizuotus fermentus, nes bus sumažintas imuninis atsakas, sukeltas fermentų nuotėkio. Dėka CLEC temperatūrinio stabilumo neįvyksta fermentų denatūracija saugojimo metu dėl laikinos aukštos temperatūros, galima tikėtis, jog CLEC išlaikys aukštą aktyvumą saugant net prie kambario temperatūros. Be to CLEC bus pigiau ir patogiau naudoti, nei analogiškus fermentus, imobilizuotus tradiciniais būdais, kadangi jie turi ilgesnį darbo ir saugojimo laiką.

Papildomi CLEC technologijos pritaikymai: biosensoriai

CLEC arba jų rinkinys gali būti vartojami kaip dalis sensoriaus, čia vadinamu biosensoriu, kuris gali būti panaudotas aptikimui ir/arba kiekybiniam dominančios medžiagos (analito) įvertinimui įvairiuose tokiose terpėse (fluiduose), tokiose kaip organizmo skysčiai (pvz.: kraujas, šlapimas), chemijos pramonės ir laboratorinės reakcinės terpės, organinės terpės, vanduo, terpės, kuriose auginamos kultūros, ir gėrimai. Kai kuriais atvejais, dominančia tokia terpe gali būti dujos, kaip pavyzdžiui iškvepiamo alkoholio analizatoriuje (Barzana, E., Klibanov, A., and Karell, M., NASA Tech Briefs 13: 104 (1989)). Šiame pritaikyme sudaromas kontaktas tarp atitinkamai parinkto CLEC ar jų rinkinio ir analizuojamos tokios terpės, turinčios dominantį analitą. Ši medžiaga gali būti išmatuota tiesiogiai (pavyzdžiui, gliukozės kiekis kraujyje) arba netiesiogiai (pvz., aptinkant arba išmatuojant kiekybiškai junginį, kuris yra reaktantas (produktas arba substratas) reakcijoje, vykstančioje dalyvaujant dominantiam analitui). Bet kuriuo atveju CLEC gali paveikti analitą ar junginį, esantį reaktantu reakcijoje, kurioje taip pat dalyvauja analitas.

Veikiant fermentui gaunami pastebimi pokyčiai (pvz., pH pakitimai, šviesos arba šilumos išspinduliavimas, elektrinio potencialo pakitimai), kurie aptinkami ir/arba išmatuojami kiekybiškai atitinkamais matavimo prietaisais (pvz., pH elektrodu, prietaisu jautriui šviesai ar šilumai, priemonėmis matuojančiomis elektrinio potencialo pokyčius) (Janata, J., et al., Anal. Chem. 62: 33R-44R (1990)). Gali būti panaudoti bet kokie prietaisai, sugebantys aptikti pakitimus, sukeltus fermentine katalize paremtu būdu. Šio išradimo biosensoriai sudaryti iš CLEC ar jų rinkinio ir priemonių, skirtų CLEC sulaikymui ir leidžiančių susidaryti kontaktui tarp CLEC ir dominančio analito arba junginio, esančio reaktantu reakcijoje, kurioje dalyvauja dominantis analitas.

4 lentelė

Naudojamas fermentas	Aptikimas ko:	Pritaikymas	Literatūra
gliukozės oksidazė	gliukozė	diabetikai	Daniles, B., Mossabach, K., Methods in Enzymology 137: 4-7 (1987) Hall. E "Biosensors" Open University Press (1990) Taylor, R., Proceed. Biotechnology Conference 1989; 275-287 Anthony ir kt., "Biosensors, Fundamentals and Applications", Oxford University Press (1987)
kreatinino deiminazė	kreatininas	inkstų funkcijos	Tabata, M., ir kt., Anal. Biochem. 134: 44 (1983)

4 lentelė, tęsinys

Naudojamas fermentas	Aptikimas ko:	Pritaikymas	Literatūra
ureazė	šlapalas	inkstų funkcijos	Hsue, G.H. ir kt., Polym. Mater. Sci. Eng. 57: 825-829 (1987) Kobos, ir kt., Anal. Chem. 60: 1996-1998 (1988)
laktato oksidazė & dehidrogenazė	laktatas	klinikiniai taikymai	Blaedel, W.J. & Jenkins, R.A., Anal. Chem. 48(8): 1240 (1976) Sagaguchi, Y., ir kt., J. Appl. Biochem 3: 32 (1981)
gliukozės-6-piruvato dehidrogenazė	gliukozės-6-fosfatas, sacharozė ir ATF	diabetikai ir kiti medicininiai taikymai	ten pat kur apie gliukozės oksidazę
alkoholdehidrogenazė, alkoholio oksidazė	etanolis & kiti alkoholiai	acto, skruzdžių rūgštys išskiepamo oro analizatoriai ir pramoniniai taikymai	Romette, J.L. ir kt., Methods in Enzymology 137: 217-225 (1987) Ho, M.H., Methods in Enzymology 137: 271-288 (1987)
β-fruktozidazė	sacharozė	pramoniniai taikymai	Romette, J.L. ir kt., Methods in Enzymology 137: 217-225 (1987)
cholesterino oksidazė	cholesterinas	cholesterino tikrinimas	Satoh, I., Methods in Enzymology 137: 217-225 (1987)
katalazė	šlapimo rūgštis, cholesterolinas	aterosklerozė ir kiti medicininiai taikymai	Saton, I., Methods in Enzymology 137: 217-225 (1987)
karboksipeptidazė	metotrek-satas	vėžys	ten pat kur apie gliukozės oksidazę

4 lentelė, tęsinys

Naudojamas fermentas	Aptikimo ko:	Pritaikymas	Literatūra
anglies anhidrazė	anglies dvideginis	pramoniniai, laboratoriniai & aplinkos saugojimo	ten pat kur apie gliukozės oksidazę
L-amino rūgšties oksidazė	amino rūgštys	medicininiai ir pramoniniai taikymai	ten pat kur apie gliukozės oksidazę
β -laktamazė penicilinazė	penicilinas	medicininiai taikymai	Anzai ir kt., Bull. Chem. Soc. Jpn. 60: 4133-4137 (1988)
šarmų fosfatazė	fosfatai	metabolitų kontrolė	ten pat kur apie gliukozės oksidazę
nitratų/nitritų reduktazė	nitratai & nitritai	metabolitų ir maisto kontrolė	ten pat kur apie gliukozės oksidazę
arilsulfatazė	sulfatai	metabolitų kontrolė	ten pat kur apie gliukozės oksidazę
sukcinatdehidrogenazė	sukcinatai	pramoniniai taikymai	ten pat kur apie gliukozės oksidazę
bakterinė liuciferazė	FMNH ₂ ir susietos reakcijos	aptikimas iki 10 ⁻¹⁸ M FMNH ₂ kiekio matuojant fotonų išspinduliavimą	Wannlund J., ir kt., "Luminescent assays: Perspectives in endocrinology and clinical chemistry"; Eds Serio, M. and Pazzagli, M. 1: 125 (1982) Kurkijarvi ir kt., Methods in Enzymology 137: 171-181 (1987)
skraidančių jonvabalių liuciferazė	ATF ir susietos reakcijos	aptikimas iki 10 ⁻¹² M ATF kiekio matuojant fotonų išspinduliavimą	Kurkijarvi ir kt., Methods in Enzymology 137: 171-181 (1987) Murachi ir kt., Methods in Enzymology 137: 260-271 (1988)

4 lentelėje pateikti kai kurie biosensoriniai pritaikymai, kuriuose gali būti panaudoti CLEC. Šiuo metu tuose taikymuose naudojami imobilizuoti fermentai, bet susiduriama su sunkumais dėl žemo stabilumo, mažo fermentų tankio, trumpo išgyvenimo periodo ir blogo pasikartojamumo. Pateiktus pavyzdžius lengvai galima pritaikyti prie čia atskleistos CLEC technologijos.

Šio išradimo būde, kai jis naudojamas pavyzdžių analizėje kaip biosensorius, ypatingai svarbu gauti didžiausią signalą, kurį galima detektuoti, naudojant kaip galima mažesni kiekį substrato ir katalizatoriaus. Šiuo požiūriu, čia atskleista CLEC technologija ypatingai patraukli, kadangi ji pasiekia maksimaliai galimą fermentinio katalizatoriaus koncentraciją duotame tūryje.

Dažnai dedamos didžiulės pastangos tam, kad sujungti, tiesiogiai ar per tinkamą tarpininką, dominančią galutinę fermentinę reakciją su fermentų, tokių kaip liuciferazė, šviesos išspinduliavimu (Kurkijarvi ir kt., *Methods in Enzymology* 137: 171-181 (1988)). Tai daroma tam, kad pasinaudoti neparaleliu jautrumu ir efektyvumu prietaisų, skaičiuojančių fotonus, kurie prie atitinkamų sąlygų leidžia aptikti femtomolines fermentinės reakcijos produkto koncentracijas. Pagal šį principą buvo sukurtos biosensorinės sistemos, naudojančios tradiciniais būdais imobilizuotus fermentus ir skirtos aptikimui įvairių substratų, įdomių klinikiniuose ir kituose taikymuose. Šviesą išspinduliuojančios reakcijos buvo sujungtos su mėginių reakcijomis, aptikimui tokių substratų kaip D-gliukozė, L-laktatas, L-glutamatas ir etanolis, bei eilės kitų, prie ypatingai žemų substrato koncentracijų.

Kas dėl šio taikymo, tai fermentas liuciferazė iš *Vibrio harveyi*, kaip aprašyta, buvo kristalizuotas (Swanson ir kt., J. Biol. Chem. 260: 1287-1289 (1985)). Šios liuciferazės kristalai gali būti susiūti, naudojant glutaraldehydą ar kitą tinkamą reagentą, tam, kad suformuoti liuciferazės CLEC. Biosensoriniams ir analitiniams pritaikymams, liuciferazės CLEC turi daug pranašumų, lyginant su tradiciniais būdais imobilizuotais fermentais. CLEC atveju, visas liuciferazės CLEC tūris sudarytas iš šviesą spinduliuojančių fermentų. Tuo tarpu sistemoje su tradiciniais būdais imobilizuotu fermentu net 95% viso tūrio užima "inertinė" nešiklio medžiaga, kuri greičiau veikia kaip fermentų išspinduliuotos šviesos absorbuotojas. Be to, padidintas CLEC stabilumas turėtų supaprastinti saugojimą kambario temperatūroje ir, taip pat, įgalinti naujus sensorinius pritaikymus agresyviose aplinkose ir pakeltose temperatūrose.

20 **Papildomi CLEC technologijos pritaikymai - laboratorinės reakcijos**

CLEC galima naudoti kaip laboratorinius reagentus mažose kolonose arba cikliniuose procesuose, vartojamuose laboratorinių reakcijų vykdyme. Kai kurios iš platesnių, reakcijų kategorijų pateiktos 5 lentelėje.

5 lentelė

Naudojamas fermentas	Katalizuojamos reakcijos tipas	Literatūra
lipazės, fosfolipazės	Stereoselektyvi sintezė: tame tarpe esterifikacija, transesterifikacija, aminolizė, laktonizacijos, polikondensacijos, acilinimas, oksimolizė ir raceminių mišinių išskyrimas	Zaks, A. & Klibanov, A.M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 82: 3192-3196 (1986) Klibanov, A.M. Acc. Chem. Res. 23: 114-120 (1990) ir nuorodos jame Wong. C.H., Chemtracts-Organic Chemistry 3: 91-111 (1990) ir nuorodos jame
esterazės	Stereoselektyvi sintezė ir išskyrimas	Kobayashi ir kt., Tetrahedron Letters Vol 25, #24: 2557-2560 (1984) Schneider ir kt., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl. 23 (#1): 64-68 (1984)
tirozinazė	fenolų oksidacija chinonų gamybai	Kazandjian, R.Z. ir Klibanov, A.M.J. Am. Chem. Soc 110: 584-589 (1986)
proteazės, pvz., subtilizinas	stereoselektyvus karbohidratų acilinimas	Riva ir kt., J. Am. Chem. Soc. 110: 584-589 (1988)
oksidazės	selektyvi hidrokarbonatų oksidacija	Klibanov, A.M. Acc. Chem. Res. 23: 114-120 (1990) ir nuorodos jame
kiti fermentai, nereikalaujantys kofaktorių: izomerazės, liazės, aldolazės, glikoziltransferazės, glikozidazės	Stereoselektyvi sintezė	Wong. C.H., Chemtracts-Organic Chemistry 3: 91-111 (1990) ir nuorodos jame

5 lentelė, tęsinys

Naudojamas fermentas	Katalizuojamos reakcijos tipas	Literatūra
kiti fermentai, nereikalaujantys pridėtų kofaktorių: flavofermentai, piridoksal-fosfatiniai fermentai, metalo fermentai	Stereoselektyvi sintezė	Wong. C.H., Chemtracts-Organik Chemistry 3: 91-111 (1990) ir nuorodos jame
fermentai, reikalaujantys kofaktorių: kinazės (ATF), oksidoreduktazės (NAD/F), metiltrasferazės (SAM), CoA-reikalaujantys fermentai, sulfurazės (PAPS)	Stereoselektyvi sintezė	Wong. C.H., Chemtracts-Organik Chemistry 3: 91-111 (1990) ir nuorodos jame

5 Šneideris ir kt. (Agnew. Chem. Int. Ed. Engl. 23 (No. 1): 64-68 (1984)) iliustruoja, kaip galima panaudoti fermentus organinės sintezės procesuose. Kiaulės kepenų esterazė naudota transformuojant mezo-esterį į chiralinį mono-esterį vandeniniame fosfato buferyje.

10 Reakcijų, katalizuojamų CLEC pagalba, naudojimo laboratorijoje pranašumas yra trigubas. Pirma, CLEC išlaiko didelį aktyvumą agresyviose aplinkose (pvz., vandeniniuose, organiniuose, beveik bevandeniuose tirpikliuose ir jų mišiniuose bei aukštoje temperatūroje), kurios yra būdingos cheminės sintezės laboratoriniams bandymams. Antra, CLEC yra labai stabilus darbo ir

15

- saugojimo metu, o tai svarbu nuolat pertraukiamiems laboratoriniams bandymams. Trečia, didelis CLEC aktyvumas tūrio vienetui leidžia sutrumpinti reakcijos laiką ir sumažinti būtina fermento kiekį (aktyvumo vienetui). Taigi, pranašumai, kuriuos turi CLEC-fermentai, lyginant su laisvais arba imobilizuotais fermentais, duoda chemikams-organikams alternatyvų, labai selektyvų, sintetinio instrumentą.
- 10 Visuose minėtuose pavyzdžiuose, ir ne tik juose, šitos srities specialistas gali pritaikyti šio išradimo būdą tam, kad panaudoti atitinkamą CLEC fermentą procese, kuriame buvo naudojamas fermentinis katalizatorius, imobilizuotas tradiciniu būdu. CLEC ne tik gali
- 15 pakeisti fermentus, imobilizuotus tradiciniais būdais, bet taip pat gali būti panaudojami transformacijose, kurios buvo vykdomos ląstelių pagalba. Toliau šis išradimas bus iliustruojamas žemiau pateiktais pavyzdžiais, kuriais jokių būdu nesiekama susiaurinti
- 20 išradimo apimtį.

1 pavyzdys

- 25 **Termolizino kristalizavimas ir skersinis susiuvimas aspartamo pirmtako, Z-Asp-Phe-OMe, sintezei.**

Kristalizacija

- 250 mg termolizino Bacillus thermoproteolyticus, piršto iš Boehringer-Mannheim GmbH kompanijos, ištirpinta 4ml
- 30 45% dimetilsulfoksido (DMSO) ir 55% 1,40M kalcio acetato, 0,50M natrio kakodilato, esant pH 6,5. Šios pradinės sąlygos analogiškos aprašytoms Matthews ir kt. stambiujų termolizino kristalų (difrakcinės kokybės)
- 35 gamybai, (žr., pvz. Holmes ir Matthews, J. Mol. Biol. 160: 623-639 (1982)). Po to baltymų tirpalas koncentruojamas iki 1 ml mikrokoncentratoriuje "Cen-

tricon-10". Gera mikrokristalų išeiga buvo gauta staigios kristalizacijos būdu, pavaizduotu šiame aprašyme, pagal kuri 1ml vandens arba 1,40M kalcio acetato, 0,50M natrio kakodilato, esant pH 6,5, greitai
5 įvesdavo į tą ar kitą DMSO - termolizino tirpalą, aprašytą anksčiau. Šiuo būdu gaunama daugybė maždaug vienodo dydžio (apie 10-1 mm ilgio) heksagonalinių mikrokristalų.

10 Termolizino mikrokristalų susiuvimas

Procedūros, atliktos šiame konkrečiame pavyzdyje pagal išradimą, yra pritaikymas protokolo, aprašyto Nakanishi ir kt. (Biotechnology 3: 459-464 (1985)), pagal kuri
15 termolizinas pradžioje adsorbuotas ant granuliuoto nešiklio, sudaryto iš jonitinės dervos Amberlite XAD-7, o po to imobilizuotas susiuvant jį glutaraldehidu (Quicho ir Richards, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 52: 833-839 (1964)). Šiame pavyzdyje gautieji termolizino
20 mikrokristalai centrifūguojami ir nusodinami, o supernatantas išpilamas. Po to prie mikrokristalų pridedama 5 ml 17,5% techninio glutaraldehido 2,5% DMSO, 0,05M kalcio acetato ir 0,025M natrio kakodilato, esant pH 6,5. Mišinys inkubuotas 4 valandas 37°C
25 temperatūroje lengvai maišant. Skersinio susiuvimo reakcija nutraukiama pakartotinai praplaunant kristalus 10 ml vandens mėginiais glutaraldehido tirpalo pašalinimui. Praplauti susiūti termolizino kristalai ir sudaro tą termolizino CLEC, kuris toliau naudojamas
30 kaip katalizatorius.

Z-Asp-Phe-OMe sintezė vandeniniame tirpale

35 5ml termolizino CLEC suspensijos pridedama į ciklinį reaktorių su nuolatiniu maišymu, inkubuojama 37°C temperatūroje. Centrifūgavus ir dekantavus supernatantą, prie CLEC pridedamas vandeninis reakcinis

mišinys. Šis tirpalas gaunamas sumaišant 80 mg Z-L-Asp ir 80 mg L-Phe-OMe-HCl 1 ml vandens; kad būtų pH 7,0 pridedama acto rūgšties. Pavyzdžiai analizuoti HPLC pagalba. 6 lentelėje pateikti substrato Z-L-Asp-HPLC piku aukščiai po nurodyto reakcijos laiko, normalizuoti iki 1, esant laikui $t=0$. Kadangi Z-L-Asp apriboja šios reakcijos greitį, tai šios medžiagos kiekio sumažėjimo matavimas yra ekvivalentiškas matavimui atsiradusio produkto Z-L-Asp-L-Phe-OMe (Nakanishi et al. Biotechnology 3: 459-464 (1985)). Be dar nesureagavusio ribojančio substrato Z-L-Asp normalizuotų HPLC piku aukščių, 6 lentelėje taip pat pateiktas reakcijos užbaigtumo lygio įvertinimas. Aišku, kad reakcija pasiekia 20% užbaigtumo lygį per pirmąsias 30 sekundžių ir išeina į plato. Šie rezultatai atitinka Nakanishi ir kt. stebėjimams (Biotechnology 3: 459-464 (1985)), gautiems panaudojus termolizina, imobilizuotą tradiciniais būdais, vandenėje reakcinėje terpėje, analogiškoje aukščiau minėtai, ir gali būti paaiškinti blogu produkto Z-L-Asp-L-Phe-OMe tirpumu vandenyje.

6 lentelė

Reakcijos trukmė (sek)	Piko aukštis (normalizuotas)	Užbaigtumo procentas
0	1.000	
30	0.727	27.3%
60	0.857	14.3%
120	0.940	6.0%
180	0.797	20.3%

25 Z-Asp-Phe-OMe sintezė beveik bevandeniame tirpale

5 ml termolizino CLEC suspensijos pridedama į periodinį reaktorių su nuolatiniu maišymu, inkubuojant 37°C. Po centrifūgavimo ir supernatanto dekantavimo, prie CLEC pridedama beveik bevandenės organinės reakcinės terpės.

Šis tirpalas gaminamas sumaišant 80 mg Z-L-Asp ir 240 mg L-Phe-OMe 1 ml 99% etilacetato su 1% vandens. Pavyzdžiai analizuoti HPLC pagalba. 7 lentelėje pateikti substrato Z-L-Asp HPLC pikų aukščiai po nurodyto reakcijos laiko, normalizuoti iki 1, esant laikui $t=0$. Kadangi Z-L-Asp apriboja šios reakcijos greitį, tai šios medžiagos kiekio sumažėjimo matavimas yra ekvivalentiškas matavimui atsiradusio produkto Z-L-Asp-L-Phe-OMe (Nakanishi ir kt. Biotechnology 3: 459-464 (1985)). Be normalizuotų HPLC pikų aukščių, dar nesureagavusio ribojančio substrato Z-L-Asp, 7 lentelėje taip pat pateiktas reakcijos užbaigtumo lygio įvertinimas. Šiuo atveju, reakcija pasiekia 70% užbaigtumo lygį per pirmąsias 30 sekundžių ir išeina į plato. Šie rezultatai taip pat atitinka Nakanishi ir kt. stebėjimams (Biotechnology 3: 459-464 (1985)), gautiems panaudojus termolizina, imobilizuotą tradiciniais būdais, beveik bevandenėje reakcinėje terpėje, ir yra aiškinami produkto sukeltu fermento inhibavimu.

7 lentelė

Reakcijos trukmė (sek)	Piko aukštis (normalizuotas)	Užbaigtumo procentas
0	1,000	
30	0,323	67,7%
60	0,314	68,6%
120	0,305	69,5%
180	0,272	72,8%

2 pavyzdys

**Termolizino kristalizavimas, skersinis susiuvimas ir
liofilizacija ir gautojo produkto charakteristikų
įvertinimas**

5

Termolizino kristalizacija

Termolizinas (Diawa Kasei K.K., Japonija) ištirpinamas
10mM kalcio acetato (Sigma), esant pH 10, iki 10%
koncentracijos (svoris/tūris). Tirpalo pH palaikomas
10,0 lygyje titruojant jį 2 M NaOH. Po pilno ištirpimo,
baltymo tirpalas titruojamas 2M HCl iki pH 8,0.
Pridedama sauso kalcio acetato iki 1,2M. Po to iki 30%
pridedama dimetilo sulfoksido (Sigma). Baltymas
koncentruojamas iki 100 mg/ml ultrafiltracijos būdu
Amikon maišomoje kameroje (membrana 10000 MWCO). Po to
koncentruotas fermentas buvo išdalintas į mėginius ir
laikomas -70°C temperatūroje. Termolizinas kristali-
zuojamas pridedant 9 tūrius demineralizuoto vandens į
1 tūrį koncentruoto (100 mg/ml) baltyminio tirpalo.
Tirpalas trumpai maišomas ir paliekamas per naktį
kambario temperatūroje. Kristalai praplaunami su
10 tūrių 10 mM kalcio acetato pH 7,0 ir išskiriami
centrifūguojant nedideliu greičiu (10 min. prie
1500 x G, Beckman GPR centrifūga).

Greitas vandens įpylimas į koncentruotą (100 mg/ml)
termolizino tirpalą sukelia susidarymą kristalų, kurie
tampa matomi po 10 min. mažu padidiniu. Šiuo būdu
gaunamų kristalų dydis pasikartojančiai priklauso nuo
galutinės baltymo koncentracijos. Esant 3 tūriams
vandens ir vienam tūriui termolizino koncentrato
(100 mg/ml) susidaro 0,5 mm ilgio heksagonalinės
rentgenografinės kokybės kristalinės lazdelės, kurios
atitinka kristalus, anksčiau aprašytus Colman ir kt.
(Colman, P.M., Jansonius, J.N. ir Matthews, B.W., J.

Mol. Biol. 70: 701-724 (1972)), ką mes patvirtinome difrakcinės analizės pagalba. Įpylus 10 tūrių vandens į vieną koncentruoto baltymo tūrį, gaunamų kristalų ilgis sumažėja iki 0,05 mm. Šie mikrokristalai yra pranašesni naudojant CLEC, kadangi sumažėja difuzinės problemos, susijusios su kristalų dydžiu (žr. pvz. Quioco, F.A. ir Richards, F.M. Biochemistry 5: 4062-4076 (1967)). Vienoje konkrečioje baltymų partijoje kristalų dydis išlaikomas pastovus. (Šiame tyrinėjime naudoti 0,05-0,10 mm ilgio kristalai, siekiant palengvinti tikslų kristalų suspensijos matavimą pipete). Densitometrinis SDS-PAGE skanavimai parodė šešiakartį fermento išvalymą kristalizuojant, o tai žymiai padidina specifinį CLEC aktyvumą. Kristalizacija sąlygojo 20% sumažėjimą bendro CLEC baltymo aktyvumo, palyginus su tirpiuoju termolizinu, ką parodė žemiau aprašyti spektrofotometriniai tyrimai skaldant dipeptidinį substratą furilakriloilglicil-L-leucino amidą (FAGLA).

20 Termolizino kristalų skersinis susiuvimas

Termolizino kristalų susiuvimas buvo atliekamas 3 val. kambario temperatūroje 12,5% glutaraldehido (Sigma), 5% DMSO ir 50 mM Tris tirpale, esant pH 6,5. Susiūti kristalai tris kartus praplaunami demineralizuotu vandeniu ir išskiriami centrifūguojant nedideliu greičiu, kaip aprašyta termolizino kristalizavimo poskyryje. Fermento kristalų cheminis skersinis susiuvimas pakankamai stabilizuoja kristalinę gardele ir kristalą sudarančias fermento molekules, kad CLEC būtų galima praktiškai naudoti terpėse, kurios kitaip nesuderinamos su fermento funkcionavimu. Tyrinėjant spektrofotometriškai (aprašyta žemiau) dipeptidinio substrato FAGLA skaldymą, nebuvo pastebėta skirtumų tarp susiūtų ir nesusiūtų kristalų fermentinių aktyvumų. Be to, susiuvimas stabilizuoja CLEC iki tokio lygio, kad jie gali būti liofilizuoti, išsaugant pilną

fermentinį aktyvumą po jų atstatymo vandeniniuose, organiniuose ir mišriuose vandens-organiniuose tirpikliuose, kaip parodyta 1 pav. ir 8 lentelėje. Nors kristalizacija sąlygojo CLEC baltymų specifinio aktyvumo sumažėjimą 30%, lyginant su tirpiu termolizinu, CLEC susiuvimas ir liofilizacija vėliau nemažino jo specifinio aktyvumo.

8 lentelė - Termolizino aktyvumas

10

Absorbicija 345 nm

	Laikas (min)	CLEC	Tirpus fermentas
1	0,0	0,314	0,315
2	1,0	0,272	0,271
3	3,0	0,235	0,218
4	5,0	0,204	0,198
5	10,0	0,184	0,185
6	15,0	0,183	0,184

Tirpaus termolizino ir jo CLEC fermentinis aktyvumas

15

Tirpiojo ir CLEC termolizino katalitinis aktyvumas buvo vertinamas (Feder, J. ir Schuck, J.M., Biochemistry 9: 2784-2791 (1970)) blokuoto dipeptidinio substrato furilakriloil-glicil-L-leucino amido (FAGLA) (Schweizerhall) hidrolizės pagalba. Amidinių ryšių nutraukimas matuotas registruojant spektrofotometriškai absorbavimo sumažėjimą 345 nm bangos ilgiui. Pradinė fermento koncentracija buvo 10^{-7} M pagal Bradford baltymų matavimo metodą ir densitometrinių dažytų Coomassie SDS-PAGE gelių skanavimą (Pharmacia LKB UltroScan XL). CLEC fermentai tai atstatyti liofilizuoti susiūti termolizino kristalai. Tirpus fermentas tai termolizinas koncentruotas iki 100 mg/ml. Fermento pridėta prie 5 ml reakcinės terpės, turinčios substratą. Nurodytu laiku buvo imami vienodo dydžio

30

reakcinio mišinio mėginiai ir matuojama jų absorbcija
prie 345 nm. Prieš matuojant absorbciją, termolizino
CLEC buvo atskiriamas nuo reakcinio mišinio trumpai
centrifūguojant (Beckman, mikrocentrifūga E).
5 Absorbcija buvo aproksimuota pseudo pirmos eilės
greičio lygties pagalba ir santykis k_{cat}/K_m buvo
skaičiuojamas dalinant aproksimuotą reikšmę iš fermento
koncentracijos (Multifit 2.0 Curve Fitting for the
Apple Macintosh Computer, Day Computing P.O. Box 327,
10 Milton, Cambridge CB4 6WL, U.K. (1990)).

Priklausomybė nuo pH ir stabilumas

Tirpaus termolizino ir jo CLEC optimalus pH ir
15 stabilumas lygintas skaldant dipeptidinį substratą
FAGLA. Rezultatai parodyti 2 pav. ir 9 lentelėje. Tiek
tirpaus tiek ir kristalinio fermento maksimalus
aktyvumas buvo prie pH 7. CLEC ir tirpus termolizinas,
taip pat, turėjo panašų aktyvumą rūgštiniame diapazone
20 ir varpo formos pH profilis gautas tirpaus fermento
atveju puikiai sutapo su publikuotais duomenimis
(Feder, J. ir Schuck, J.M., Biochemistry 9: 2784-
2791 (1970)). Tačiau, šarminiame pH diapazone
kristalinis fermentas išlaikė maksimalų aktyvumą iki pH
25 10, tuo tarpu tirpus fermentas turėjo 75% aktyvumo prie
pH 8,5, ir tik 25% aktyvumo prie pH 9. Esant pH 9,6,
tirpus fermentas buvo visiškai neaktyvus.

9 lentelė - Termolizino pH kreivė

% nuo maksimalaus aktyvumo

	pH	CLEC	Tirpus fermentas
1	5,0	10,25	5,17
2	5,5	9,75	6,07
3	6,0	52,50	39,10
4	6,5	85,00	74,61
5	7,0	97,50	100,00
6	7,5	100,00	98,65
7	8,0	97,50	82,92
8	8,5	95,00	71,91
9	9,0	96,25	24,72
10	9,5	95,00	0,00
11	10,0	90,00	0,00

5

Stabilumas prie pakeltų temperatūrų

Vykdamas cheminius procesus prie aukštesnės temperatūros, galima pasiekti didesnę reakcijos greitį ir mažesnę substrato ir produkto difuzijos laiką, kuriuos paprastai apriboja substrato ir produkto temperatūrinis stabilumas. Tačiau, naudojant fermentinę katalizę, praktinę ribą temperatūros, prie kurios gali vykti procesas, dažniausiai nustato fermentinio aktyvumo netekimas. Dėl padidinto stabilumo, CLEC išlaiko fermentinį aktyvumą prie daug aukštesnių temperatūrų nei tirpūs fermentai.

CLEC katalizatorių padidintas stabilumas žemoms temperatūroms supaprastina kasdienį ilgalaikį jų saugojimą. Pavyzdžiui, koncentruotus (>50mg/ml) tirpaus termolizino tirpalus reikėdavo laikyti prie -80°C, kad išsilaikytų jų maksimalus specifinis aktyvumas. Kambario temperatūroje aktyvumas paprastai buvo prarandamas per vieną dieną. Palyginimui, dehidratuotas

25

termolizino CLEC paprastai gali būti laikomas ištisus mėnesius kambario temperatūroje be pastebimo aktyvumo pakitimo. Neatstatyti liofilizuoti termolizino CLEC atrodo išlieka gyvybingi neapibrėžtą laiką.

5

Termostabilumas ir atsparumas autolizei buvo pademonstruotas penkias dienas inkubuojant termolizino CLEC prie 65°C (3 pav. ir 10 lentelė). Termolizino CLEC išlaikė maksimalų aktyvumą po penkių dienų inkubacijos prie pakeltos temperatūros. Palyginimui, tirpus termolizinas prarado 50% savo pradinio aktyvumo tik po dviejų valandų inkubacijos, o po 24 valandų inkubacijos 65°C temperatūroje rodė vos pastebimą aktyvumą.

10

15 **10 lentelė - Termolizino termostabilumas prie 65°C**

% nuo maksimalaus aktyvumo

	Laikas (dienos)	CLEC	Tirpus fermentas
1	0,000	100,0	100,0
2	0,041		70,0
3	0,083	0,96	50,0
4	0,164		32,0
5	0,246		17,0
6	0,410	97,0	10,0
7	1,000	101,0	2,0
8	2,000	97,0	
9	3,000	94,0	
10	4,000	96,0	
11	5,000	92,0	

20 Tirpus termolizino ir jo CLEC aktyvumas buvo matuojamas po inkubacijos prie 65°C. Tirpus termolizinas buvo inkubuojamas 10 mM kalcio acetate, 50 mM Tris, esant pH 7, 65°C vandens vonioje. Reakcinės terpės tūris užėmė 500 µl. Galutinė fermento koncentracija buvo 10 mg/ml. Vienodi mėginiai buvo imami po

25

0, 1, 2, 6, 10 ir 18 valandų. Pavyzdžiai buvo tiriami naudojant SDS-PAGE ir FAGLA skaldymą prie kambario temperatūros, kaip aprašyta aukščiau. Termolizino CLEC atveju, 250 µl kristalų suspensijos 10 mM kalcio acetate ir 50 mM Tris buvo inkubuojami 65°C vandens vonioje. Aktyvumas buvo tiriamas po 0, 1, 6, 24, 48, 72, 96 ir 120 valandų FAGLA skaldymo būdu.

Atsparumas egzogeninei proteolizei

10

Taip pat, buvo įvertintas termolizino CLEC atsparumas egzogeninių proteazių poveikiui. SDS-PAGE (elektroforezė natrio dodecilsulfato poliacrilamido gelyje) analizė rodo, kad komerciniai fermentai gali turėti žymų procentą priemaišų, kai kurios iš jų gali turėti proteolitinių aktyvumą pagrindinių fermentų rūšių atžvilgiu. Supakavus fermento molekules į kristalinę gardelę, galima tikėtis jog CLEC viduje fermento molekules bus apsaugotos nuo proteolizės. Tam kad tai patikrinti, termolizino CLEC ir tirpaus termolizino preparatai buvo inkubuojami terpėje su streptokoko proteaze Pronaze®, nespecifine proteaze, galinčia suardyti daugumą baltymų iki laisvų amino rūgščių (Calbiochem 1990 Catalog, LaJolla, CA).

25

Tirpus termolizinas ir jo CLEC buvo inkubuojami 50 mM Tris su proteaze Pronaze® (Calbiochem), esant pH 7,5 prie 45°C. Pronazės® ir termolizino santykis buvo 1/40. Kad prislopinti termolizino autolizę ir išvengti pronazės suardymo dėl proteolitinio termolizino poveikio, prie tirpių fermentų reakcinės terpės buvo pridėtas EDTA su galutine 100 mM koncentracija (EDTA inhibuoja termolizino aktyvumą, bet nekeičia Pronaze® aktyvumo). Nurodytu laiku buvo imami reakcinio mišinio mėginiai ir spektrofotometriškai tiriamas jų aktyvumas, skaldant dipeptidinių substratą FAGLA. Kad pašalinti termolizino inhibavimą dėl EDTA, tirpių fermentų

35

aktyvumo spektrofotometriniai tyrimai buvo atliekami 0,5 M kalcio acetato buferyje, esant pH 7, ir fermento koncentracija buvo padvigubinta. Susiūti kristaliniai fermentai buvo tiriami kaip aprašyti aukščiau.

5

Kaip matosi iš 4 pav. ir 11 lentelės, tirpus termolizinas greitai degradavo ir prarado visą aktyvumą po 90 minučių inkubavimo. Palyginimui CLEC aktyvumas nepasikeitė po keturių dienų inkubavimo proteazės aplinkoje. Šis beveik visiškas atsparumas proteolizei ypač domintų diagnostiniuose biosensorių taikymuose, kuriuose atitinkamas CLEC gali būti veikiamas kokteilio iš nežinomų, natūraliai egzistuojančių fermentų su proteolitiniu veikimu.

15

11 lentelė - Proteazinis atsparumas

% nuo maksimalaus aktyvumo

	Laikas (dienos)	CLEC	Tirpus fermentas	Laikas (min)
1	0,000	100,0	100,0	0,000
2	0,003		25,0	5,000
3	0,010		17,5	15,000
4	0,021		9,5	30,000
5	0,042	89,0	3,0	60,000
6	0,063		1,0	90,000
7	0,084	101,0	0,0	
8	1,000	97,0		
9	2,000	99,0		
10	3,000	98,0		
11	4,000	96,0		

20

Stabilumas, esant organiniams tirpikliams

Tam, kad fermentai taptų idealiai priimtinais, gyvybingais pramoniniais katalizatoriais, jie turi sugebėti funkcionuoti, nereikalauti per didelio

25

5 pakeitimo praktiškai nusistovėjusių aplinkų gamybiniuose procesuose. Konkrečiau, tai apimtų vandeninių, poliarizuotų, vandeninių-organinių tirpiklių bei jų mišinių naudojimą. Komerciniuose taikymuose, vandeninių-organinių tirpiklių mišiniai leidžia valdyti produkto susidarymą, pasinaudojant produktu ir substratų santykinu tirpumu.

10 Tirpus termolizinas ir jo CLEC organiniuose tirpikliuose turi ryškiai skirtingą stabilumą (12 lentelė). Tirpus fermento koncentracijos, kurias dar galima laikyti organiniame tirpiklyje, apribotos maksimalia 10 mg/ml koncentracija. Esant koncentracijoms didesnėms už šią reikšmę, termolizinas akimirksniu nusėdavo, 15 pridėjus organinį tirpiklį. Palyginimui, termolizino CLEC koncentracijos ribojamos tik kristalų užimamu tūriu. Tirpus termolizinas išlaikė didžiausią aktyvumą (75%) aktyvumą po inkubacijos acetone ir mažiausią (36%) - tetrahidrofurane. Po 1 val. inkubacijos 20 acetonitrile ir dioksane tirpus fermentas prarado apie 50% savo pradinio aktyvumo. Termolizino CLEC išlaikė daugiau nei 95% maksimalaus aktyvumo po inkubacijos visuose tirtuose organiniuose tirpikliuose.

25 **12 lentelė**

% nuo maksimalaus aktyvumo

	Tirpus fermentas	CLEC
Acetonitrilas	42	102
Dioksanas	66	97
Acetonas	75	99
Tetrahidrofuranas	36	96

Stabilumas organiniuose tirpikliuose

Termolizino CLEC arba tirpaus termolizino preparatai buvo inkubuojami 50% (tūris/tūris) nurodytų tirpiklių tirpaluose 100 μ l termolizino CLEC suspensijos (10mg/ml) su 10 mM Tris, esant pH 7, supiltas į 0,5 drachmos talpos stiklinį buteliuką. Prie jo pridėtas toks pat tūris nurodyto organinio tirpiklio ir mišinys trumpai maišomas sukant. Dvidešimt μ l tirpaus termolizino (100mg/ml) atskiesta 80 μ l 0,015 M Tris buferiu, esant pH 7, kitame 0,5 drachmos talpos stikliniame buteliuke. Po to į fermentinį tirpalą pridėta 100 μ l organinio tirpiklio ir trumpai maišoma sukant. CLEC ir tirpus fermentas buvo inkubuojami organinio tirpiklio aplinkoje vieną valandą prie 40°C. Po inkubacijos, fermentų aktyvumas buvo tiriamas dipeptidinio substrato FAGLA skaldymu, kaip aprašyta aukščiau.

Manoma, jog žemos vandens koncentracijos trukdo fermento molekulei išsivyniojant pereiti į tarpinės būsenas, jos denatūracijos metu. Fermentiniuose CLEC šiuos konformacinio judrumo apribojimus greičiau apsprendžia tarpmolekuliniai kontaktai ir skersiniai susiuvimai tarp kristalinę gardelę sudarančių fermento molekulių, nei beveik visiškas vandens nebuvimas terpėje. Todėl, fermentai, jei iš jų suformuoti CLEC, lengvai išlaiko vidutines vandens-organinio tirpiklio koncentracijas, kas anksčiau, dirbant su fermentais, nebuvo pastebėta (žr. 12 lentelė). Šis atradimas atveria fermentinės katalizės pritaikymui ištisas naujas cheminės sintezės sritis.

Tačiau, net beveik bevandeniuose organiniuose tirpikliuose įprastinis fermentų vartojimas buvo nelengvas dėl jų polinkio sudaryti blogų charakteristikų suspensijas, kurios linkusios granuluotis, ir kitų

agregacijos problemų. Dėl šių savybių plataus masto pramoniniuose procesuose tokie preparatai nepatrauklūs iš prigimties. Palyginimui, CLEC ir jo kristalinę gardelę sudarantys fermentai išlieka monodispersiniais visuose šiuose tirpikliuose.

Palyginimas su kitais imobilizacijos būdais

Literatūroje pasirodė keletas naudingų fermentų imobilizacijos būdų apžvalgų (Maugh, T.H., Science 223: 474-476 (1986); Tramper, J., Trends in Biotechnology 3: 45-50 (1985)). Tuose būduose, fermentai visada sudaro mažą dalį viso imobilizuotų dalelių tūrio, kurio pradinę dalį užima inertinė nešiklio medžiaga. Nešiklis padidina vidutinį laisvą kelią tarp imobilizuotų fermentų dalelių išorės, skalaujamos tirpiklio, ir fermentų aktyvių centrų, tuo apsunkindamas difuzijos (Quioco, F.A., ir Richards F.M., Biochemistry 5: 4062-4076 (1967)).

CLECL susiūta kristalinė matrica sudaro nuosavą pagrindą, atmesdama nešiklio būtinumą. Todėl CLEC fermento koncentracija yra artima teorinei tokio dydžio molekulių supakavimo ribai ir žymiai viršija tankius, pasiekiamus net koncentruotuose tirpaluose. Kadangi visas CLEC sudarytas iš aktyvaus fermento, tai minimizuojamas (žr. 1 pav.) reakcijos greičio sumažėjimas, susietas su difuzija ir stebimas tradiciniais metodais imobilizuotuose fermentuose, lyginant su fermentais, esančiais tirpale, nes CLEC atveju (lyginant su tradiciniais metodais imobilizuotų fermentų nešiklio dalelėmis) labai sumažėja vidutinis laisvas kelias, kuri reikia nueiti substratui tarp aktyvaus fermento ir laisvo tirpiklio. Ypač svarbu, jog CLEC sudarantis fermentas iš prigimties yra monodispersinis ir jį galima atstatyti atliekant su

CLEC dalelėmis tokias paprastas operacijas kaip filtravimą, centrifūgavimą ir tirpiklio dekantavimą.

3 pavyzdys

5

Elastazės kristalizavimas, skersinis susiuvimas ir liofilizacija ir gauto produkto charakteristikų įvertinimas

10

Elastazės kristalizacija

Liofilizuota elastazė (Serva) iš kiaulės kasos liaukos kambario temperatūroje ištirpdoma 0,1 M natrio acetate prie pH 5 iki 5 mg/ml (svoris/tūris) koncentracijos. Lazdelių pavidalo elastazės kristalai pasirodo praėjus vienai minutei po pilno baltymo ištirpimo (solvacijos). Kristalizacijos tirpalas perkeliamas į 4°C temperatūrą ir kristalizacija užbaigiama per naktį. Kristalai išskiriami centrifuguojant, kaip aprašyta anksčiau.

20

Elastazės kristalų susiuvimas

200 µl elastazės kristalų pridedama prie 1,3 ml tirpalo, turinčio 5,77% glutaraldehido ir 1,5 M natrio acetato, esant pH 5. Kristalų skersinis susiuvimas vykdomas vieną valandą lengvai maišant (maišoma lėkštėje). Po susiuvimo kristalai tris kartus praplaunami 15 ml tūrio 0,2 M Tris, esant pH 8,0. Elastazės kristalai liofilizuojami kaip aprašyta 2 pavyzdyje.

30

Tirpios elastazės ir jos CLEC fermentinis aktyvumas

Tirpios ir CLEC elastazės katalitinis aktyvumas buvo tiriamas spektrofotometriškai matuojant substrato sukcinil-(Ala)₃ p-nitroanilido (Bachem) hidrolizę [Bief, et al. Biochem. Med 11: 350-357 (1974)]

35

(13 lentelė, 5 pav.). Skaldymas stebimas registruojant absorbcijos padidėjimą 400 nm bangos ilgiui. Pradinė substrato koncentracija buvo 2×10^{-4} . Fermento koncentracija buvo $2,8 \times 10^{-7}$ M. CLEC ir tirpus fermentas pridedami prie 5 ml reakcinio tūrio su substratu ir 0,2 M Tris, esant pH 8,0. Kaip aprašyta anksčiau, CLEC fermentas buvo pašalinamas iš reakcinio mišinio, prieš matuojant absorbciją.

10 **13 lentelė**

Absorbcija 400 nm

	Laikas (min)	CLEC	Tirpus fermentas
1	0,0	0,000	0,000
2	0,5	0,103	0,205
3	1,0	0,195	0,390
4	2,0	0,366	0,672
5	3,0	0,523	0,923
6	4,0	0,657	1,098
7	5,0	0,780	1,227
8	6,0	0,888	1,326
9	7,0	0,974	1,393
10	10,0	1,170	1,512
11	15,0	1,365	1,586

15 Atsparumas egzogeninei proteolizei

Elastazės CLEC atsparumas proteazių poveikiui matuotas tokiose pat sąlygose kaip ir termolizimo (2 pavyzdys). Po inkubacijos su proteaze, tirpaus ir CLEC fermento aktyvumas įvertintas hidrolizuojant nitroanilido substratą, kaip aprašyta aukščiau (14 lentelė ir 6 pav.).

14 lentelė - Elastazės atsparumas protealizei

% nuo maksimalaus aktyvumo

	Laikas (min)	CLEC	Tirpus fermentas
1	0,0	1,00	1,00
2	10,0		53,0
3	20,0		32,0
4	30,0	101,0	18,0
5	45,0		11,0
6	60,0	102,0	8,0
7	120,0	101,0	3,0
8	180,0	103,0	2,0

5

4 pavyzdys

Esterazės kristalizavimas, skersinis susiuvimas ir liofilizacija ir gauto produkto charakteristikų įvertinimas

10

Esterazės kristalizacija

15 Kaip čia parodyta, 30 mg/ml esterazės (Fluka) iš kiaulės kepenų amonio sulfato suspensijos kambario temperatūroje ištirpdoma 0,25 M kalcio acetato tirpalo prie pH 5,6. Esterazės kristalai pasirodo po kelių minučių, pridėjus kalcio acetato tirpalo. Kristalizacijos tirpalas paliekamas kambario temperatūroje ir 20 kristalizacija užbaigiama per naktį. Kristalai išskiriami centrifūguojant, kaip aprašyta 2 pavyzdyje.

Esterazės kristalų skersinis susiuvimas

25 Kaip čia parodyta, 300 µl esterazės kristalų pridedama į 5 ml tirpalo, turinčio 12,5% glutaraldehido ir 0,5 M natrio acetato, esant pH 5,5. Kristalų skersinis susiuvimas vykdomas vieną valandą lengvai maišant

(maišoma lėkštėje). Po susiuvimo kristalai tris kartus praplaunami 15 ml tūrio 0,5 M kalcio acetatu, esant pH 6,3. Esterazės kristalai liofilizuojami kaip aprašyta aukščiau 2 pavyzdyje.

5

Tirpios esterazės ir jos CLEC fermentinis aktyvumas

Tirpios ir CLEC esterazės katalitinis aktyvumas buvo tiriamas spektrofotometriškai matuojant substrato p-nitrofenilo acetato (FLUKA) hidrolizę (15 lentelė ir 7 pav.). Skaldymas stebimas registruojant absorbavimo padidėjimą 400 nm bangos ilgiui. Pradinė substrato koncentracija buvo 0,001%. Pradinė fermento koncentracija buvo 1×10^{-8} M. CLEC ir tirpūs fermentai pridedami prie 5 ml reakcinio trio su substratu 0,25 M kalcio acetatu, esant pH 6,3. Kaip aprašyta anksčiau 2 pavyzdyje, esterazės CLEC centrifuguojant pašalinamas iš reakcinio mišinio, prieš matuojant absorbciją.

20

15 lentelė - Esterazės aktyvumas

Absorbciija 400 nm

	Laikas (min)	CLEC	Tirpus fermentas
1	0,0	0,000	0,000
2	0,5	0,770	0,252
3	1,0	0,128	0,297
4	2,0	0,208	0,337
5	3,0	0,260	0,346
6	5,0	0,324	0,353
7	7,0	0,353	0,359
8	10,0	0,369	0,368

25

Atsparumas egzogeninei proteolizei

Esterazės CLEC atsparumas proteazių poveikiui taip pat matuotas tokiose pat sąlygose kaip ir termolizino

(2 pavyzdys). Po inkubacijos su proteaze, tirpaus ir CLEC fermento aktyvumas įvertintas skaidant substratą, p-nitrofenilo acetatą, kaip aprašyta aukščiau (16 lentelė ir 8 pav.).

5

16 lentelė - Esterazės atsparumas proteolizei

% nuo maksimalaus aktyvumo

	Laikas	CLEC	Tirpus fermentas
1	0,0	100,0	100,0
2	10,0		68,0
3	20,0		47,0
4	30,0	99,0	25,0
5	45,0		20,0
6	60,0	97,0	16,0
7	120,0	94,0	10,0
8	180,0	91,0	6,0

10

5 pavyzdys

Lipazės kristalizavimas, skersinis susiuvimas ir liofilizacija ir gauto produkto charakteristikų įvertinimas

15

Lipazės kristalizacija

Kaip čia atskleista, fermentas lipazė (*Geotrichum candidum*) kristalizuotas, difunduojant garams iš vandeninio 20 mg/ml baltymo tirpalo su 50 mM Tris prie pH 5,6, turinčio 8% amonio sulfato. Bipiramidiniai kristalai pasirodo po 20-30 dienų inkubacijos kambario temperatūroje. Kristalai išskiriami centrifuguojant, kaip anksčiau aprašyta 2 pavyzdyje.

25

Lipazės kristalų skersinis susiuvimas

Kaip čia atskleista kristalai įdedami į 12,5% glutaraldehido ir 50 mM Tris tirpalą, esant pH 5,6.
 5 Kristalų skersinis susiuvimas vykdomas vieną valandą. Po susiuvimo kristalai tris kartus praplaunami 15 ml tūrio 50 mM Tris, esant pH 7,0. Lipazės CLEC liofilizuojami kaip aprašyta anksčiau 2 pavyzdyje.

10 Tirpios lipazės ir jos CLEC fermentinis aktyvumas

Tirpios ir CLEC lipazės katalitinis aktyvumas buvo tiriamas spektrofotometriškai matuojant substrato p-nitrofenilo acetato hidrolizę (17 lentelė ir 9 pav.).
 15 Skaldymas stebimas registruojant absorbavimo padidėjimą 400 nm bangos ilgiui. Pradinė substrato koncentracija buvo 0,005%. Pradinė fermento koncentracija buvo $1,5 \times 10^{-8}$ M. CLEC ir tirpūs fermentai pridedami prie 5 ml reakcinio tūrio su substratu ir 0,2 M Tris, esant pH 7,
 20 kambario temperatūroje. Kaip aprašyta anksčiau 2 pavyzdyje, prieš matuojant absorbciją, CLEC fermentas centrifūguojant pašalinamas iš reakcinio mišinio.

17 lentelė - Lipazės aktyvumas

25

Absorbacija 400 nm

	Laikas (min)	CLEC	Tirpus fermentas
1	0,0	0,000	0,000
2	1,0	0,013	0,021
3	5,0	0,094	0,116
4	10,0	0,164	0,186
5	15,0	0,248	0,258
6	30,0	0,346	0,357
7	45,0	0,407	0,420
8	60,0	0,461	0,459
9	90,0	0,497	0,502

6 pavyzdys

5 **Lizocimo kristalizavimas, skersinis susiuvimas ir
liofilizacija ir gauto produkto charakteristikų
įvertinimas**

Lizocimo kristalizacija

10 Pagal BLAKE, C.C.F. ir kt., Nature 196: 1173 (1962)
200 mg liofilizuoto vištos kiaušinio baltymo lizocimo
(Boehringer Mannheim) ištirpinta 2,5 ml 0,04 M natrio
acetato buferyje kambario temperatūroje, esant pH 4,7.
15 Po baltymo solvatacijos prie lizocimo tirpalo lašinant
pridedami 2,5 m; 10% natrio chlorido, nuolat maišant.
Kristalizacijos tirpalas paliekamas per naktį kambario
temperatūroje ir kristalizacija užbaigiama per
48 valandas. Kristalai išskiriami centrifuguojant, kaip
anksčiau aprašyta 2 pavyzdyje.

20

Lizocimo kristalų skersinis susiuvimas

Kaip čia atskleista, 500 µl lizocimo kristalų pridedama
į 10 ml 24% glutaraldehido ir 50 mM Tris tirpalą,
25 turintį 20% natrio chlorido, esant pH 5,6. Kristalų
skersinis susiuvimas vykdomas 20 minučių švelniai
maišant (maišančioje lėkštėje). Po susiuvimo kristalai
tris kartus praplaunami 50 ml tūrio 20 mM kalio
chloridu, esant pH 5,3. Lizocimo CLEC liofilizuojami
30 kaip aprašyta anksčiau 2 pavyzdyje.

Tirpaus lizocimo ir jo CLEC fermentinis aktyvumas

35 Tirpaus ir CLEC lizocimo katalitinis aktyvumas buvo
tiriamas matuojant substrato 4-metilumbeliferilo N-
acetil-chitriosido (FLUKA) (Yang, Y. ir Hamaguchi, K.,
J. Biochem. 8: 1003-1014 (1980)) (18 lentelė ir

10 pav.). 4-metilumbeliferono atpalaidavimas buvo sekamas fluorimetru (Perkin Elmer Model LS-50). Pradinė substrato koncentracija buvo $1,42 \times 10^{-3}$. Fermento koncentracija buvo 3×10^{-7} . CLEC ir tirpus fermentai pridedami prie 2 ml reakcinio tūrio su substratu ir 20 mM kalcio acetatu ir 50 mM kalio chloridu, esant pH 5,3, prie 42°C. 4-metilumbeliferono kiekis buvo registruojamas fluorimetriškai matuojant fluorescencijos intensyvumą prie 450 nm, žadinant prie 360 nm. Plyšio dydis tiek žadinimui tiek ir emisijai buvo 10 nm. Kaip aprašyta anksčiau 2 pavyzdyje, prieš matuojant fluorescenciją, fermentų CLEC buvo pašalinami iš reakcinio mišinio centrifuguojant.

15 **18 lentelė - Lizocimo aktyvumas**

Fluorescencija

	Laikas (min)	CLEC	Tirpus fermentas
1	0,0	0,0	0,0
2	10,0	4,4	18,9
3	30,0	10,5	29,4
4	60,0	27,5	44,8
5	90,0	33,8	51,7
6	120,0	45,9	59,8

20 **7 pavyzdys**

Asparaginazės kristalizavimas, skersinis susiuvimas ir liofilizacija bei gauto produkto charakteristikų įvertinimas

25

Asparaginazės kristalizacija

Modifikavus procedūrą, aprašytą Grabner ir kt. [U.S. Patent 3664926 (1972)], 25 mg liofilizuotos asparaginazės (Worthington) ištirpinama 500 µl 50 mM natrio

30

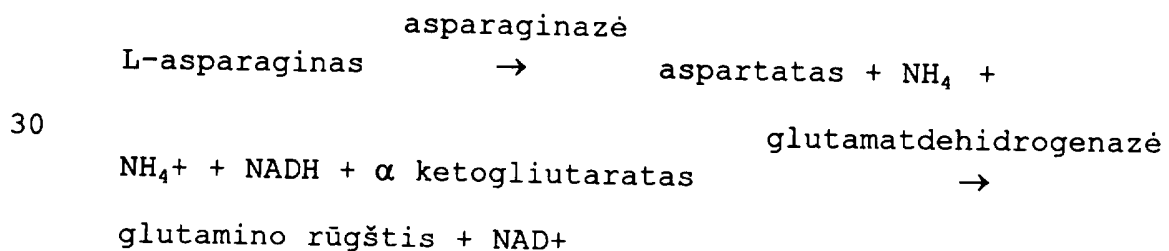
fosfato buferyje, prie pH 7,2. Tirpalas atšaldomas iki 4°C ir pasiekiamas pH 5,0 1 M acto rūgšties pagalba. Po to į asparaginazės tirpalą lašinamas šaltas etanolis (-20°C) ir pasiekiami galutinė 33% koncentracija. 5 Tirpalas inkubuojamas prie 4°C. Kristalizacija užbaigiama per keturiasdešimt aštuonias valandas. Kristalai išskiriami centrifuguojant, kaip anksčiau aprašyta.

10 Asparaginazės kristalų skersinis susiuvimas

Kaip čia atskleista, asparaginazės kristalai susiuvami 7,5% glutaraldehido ir 50 mM natrio fosfato buferio tirpale, esant pH 5,6. Po susiuvimo kristalai penkis 15 kartus perplaunami 15 ml tūrio 50 mM Tris, esant pH 7,0. Asparaginazės CLEC liofilizuojami kaip aprašyta anksčiau 2 pavyzdyje.

20 Tirpios asparaginazės ir jos CLEC fermentinis aktyvumas

Tirpios ir CLEC asparaginazės katalitinis aktyvumas buvo tiriamas spektrofotometriškai matuojant amonio evoliuciją sukabintoje fermentinėje reakcijoje, aprašytoje žemiau (visi reagentai pirkti Boehringer 25 Mannheim kompanijoje) (19 lentelė ir 11 pav.).



35 NADH oksidacija buvo registruojama matuojant absorbcijos sumažėjimą 340 nm bangos ilgiui. Pradinė NADH koncentracija buvo 10⁻³M. Alfa ketoglutatarato koncentracija buvo 10⁻³M. Glutamatdehidrogenazės koncentracija buvo 10⁻⁷M. Asparaginazės koncentracija

buvo $2,3 \times 10^{-8} M$. Kaip aprašyta anksčiau 2 pavyzdyje, prieš matuojant absorbciją, fermentų CLEC buvo pašalinamas iš reakcinio mišinio centrifuguojant.

5 **19 lentelė - Asparaginazės aktyvumas**

Absorbciija 340 nm

	Laikas (min)	CLEC	Tirpus fermentas
1	0,0	1,000	1,000
2	1,0	0,867	0,825
3	3,0	0,739	0,684
4	5,0	0,603	0,538
5	10,0	0,502	0,406
6	15,0	0,449	0,338
7	30,0	0,328	0,199
8	45,0	0,211	0,187

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Skersinio susiuvimo baltymo kristalas, vadinamas kristalu, atsparus egzogeninei proteolizei, b e s i s -
 5 k i r i a n t i s tuo, kad po inkubavimo 3 val. pronazės tirpale, jis išlaiko mažiausiai 91% savo pradinio aktyvumo, tuo tarpu, kai tirpi baltymo forma, atitinkanti šį kristalą, tose pačiose sąlygose praranda daugiau negu 90% savo pradinio aktyvumo.
- 10 2. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 1 punktą, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad kristalas yra mikrokristalas.
- 15 3. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 1 arba 2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad baltymas yra fermentas.
- 20 4. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 3 punktą, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad fermentas yra hidrolazė.
- 25 5. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 4 punktą, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad hidrolazė yra parenkama iš termolizino, elastazės, esterazės, lipazės, asparaginazės ir lizocimo.
- 30 6. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 5 punktą, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad hidrolazė yra termolizinas.
- 35 7. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 5 punktą, b e - s i s k i r i a n t i s tuo, kad hidrolazė yra asparaginazė.

8. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 5 punktą, b e -
s i s k i r i a n t i s tuo, kad hidrolazė yra
lizocimas.
- 5 9. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 5 punktą, b e -
s i s k i r i a n t i s tuo, kad hidrolazė yra
esterazė.
- 10 10. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 5 punktą, b e -
s i s k i r i a n t i s tuo, kad hidrolazė yra
elastazė.
11. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 9 punktą, b e -
s i s k i r i a n t i s tuo, kad esterazė yra lipazė.
- 15 12. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 1 arba
2 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
proteino:pronazės santykis yra 1:40.
- 20 13. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 2 punktą, b e -
s i s k i r i a n t i s tuo, kad mikrokristalas turi
 10^{-1} mm skersinio susiuvimo sekcijas.
- 25 14. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 2 punktą, b e -
s i s k i r i a n t i s tuo, kad mikrokristalas turi
skersinio susiuvimo sekcijas mažesnes, negu 10^{-1} mm.
- 30 15. Skersinio susiuvimo hidrolazės mikrokristalas,
b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad turi mažiausiai
35% hidrolazės tirpios formos katalitinį aktyvumą,
atitinkanti minima hidrolazės mikrokristalą.
- 35 16. Skersinio susiuvimo hidrolazės mikrokristalas pagal
14 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
hidrolazė yra parenkama iš termolizino, elastazės,
esterazės, lipazės, asparaginazės ir lizocimo.

17. Skersinio susiuvimo kristalas, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad fermento kristalas turi didesni,
negu 100 kartų, aktyvumo pusperiodį už tirpios formos
fermentą, atitinkanti fermento kristalą.
- 5
18. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 16 punktą,
b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šis kristalas yra
mikrokristalas.
- 10
19. Skersinio susiuvimo fermento kristalas pagal
16 arba 17 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
fermentas yra hidrolazė.
- 15
20. Skersinio susiuvimo fermento kristalas pagal
18 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
hidrolazė parenkama iš termolizino, elastazės,
esterazės, lipazės, asparaginazės ir lizocimo.
- 20
21. Skersinio susiuvimo kristalas, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad fermento kristalas turi toki
stabilumą 50 tūrių % vandens/organinio tirpiklio
mišinyje, kuri išlaiko mažiausiai 40% nuo inicijuoto
aktyvumo inkubuojant minėtame tirpiklyje mažiausiai
bent valandą.
- 25
22. Skersinio susiuvimo fermento kristalas pagal
20 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
kristalas yra mikrokristalas.
- 30
23. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 20 arba
21 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
fermentas yra hidrolazė.
- 35
24. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 22 punktą,
b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad hidrolazę parenka
iš termolizino, elastazės, esterazės, lipazės,
asparaginazės ir lizocimo.

25. Skersinio susiuvimo kristalas, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad kristalas turi sustiprintą pH
aktyvumą palyginus su hidrolazės tirpia forma, kuri
5 atitinka minimą hidrolazės kristalą.

26. Skersinio susiuvimo hidrolazės kristalas pagal
24 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad šis
kristalas stabilesnis esant šarminėms pH reikšmėms,
10 negu hidrolazės tirpi forma, atitinkanti hidrolazės
kristalą.

27. Skersinio susiuvimo kristalas pagal 24 arba
25 punktą, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad minimas
15 kristalas yra mikrokristalas.

28. Skersinio susiuvimo hidrolazės kristalas pagal
24 arba 25 punktus, b e s i s k i r i a n t i s tuo,
kad minima hidrolazė parenkama iš termolizino,
20 elastazės, esterazės, lipazės, asparaginazės ir
lizocimo.

29. Prietaisas, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
turi fermentą su skersinio susiuvimo fermento kristalu
25 pagal 3 arba 4 punktą, priemones, išlaikančias minimą
susiūtą fermento kristalą, kurios leidžia susidaryti
kontaktui tarp minimo susiūto fermento kristalo ir
substrato, kuri veikia fermentas, kai substratas yra
tokioje terpėje.

30

30. Biosensorius, skirtas nustatyti analizuojamą
medžiagą terpėje, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
jis turi:

35

a) skersinio susiuvimo fermento kristalą pagal 3 arba
4 punktą, kuriame fermentas veikia dominančią
analizuojamą medžiagą arba reagentą reakcijoje,

kurioje dominanti analizuojama medžiaga dalyvauja;
ir

5 b) minimo skersinio susiuvimo fermento kristalui
išlaikymo priemonių, turinčių medžiagas,
leidžiančias susidaryti kontaktui tarp minimo
skersinio susiuvimo fermento kristalo ir terpės,
turinčios (1) analizuojamą medžiagą, kurią veikia
10 fermentas, kai analizuojama medžiaga yra tokioje
terpėje, arba (2) reakcijos, kurioje dalyvauja
analizuojama medžiaga, reagentą, kai reagentas yra
tokioje terpėje.

15 31. Biosensorius pagal 29 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad papildomai turi detektavimo
priemonių.

20 32. Biosensorius pagal 29 punktą, b e s i s k i -
r i a n t i s tuo, kad minimas dominanti analizuojama
medžiaga yra gliukozė, kreatininas, karbamidas,
laktatas, gliukozės-6-fosfatas, sacharozė, ATF, etano-
lis, acto rūgštis, skruzdžių rūgštis, cholesterolis,
karbamido rūgštis, metotreksatas, anglies dioksidas,
aminorūgštys, fosfatai, penicilinas, nitratai,
25 nitritai, sulfatai ir sukcinatai.

30 33. Biosensorius, skirtas nustatyti analizuojamą
medžiagą terpėje, b e s i s k i r i a n t i s tuo, kad
jis turi:

35 a) skersinio susiuvimo liuciferazės kristalą pagal
3 punktą, kuriame liuciferazė veikia dominančią
analizuojamą medžiagą arba reakcijos, kurioje
dominanti medžiaga dalyvauja, produktą; ir

b) minimo skersinio susiuvimo liuciferazės kristalo
išlaikymo priemonių, turinčių medžiagos, leidžian-

5 čios susidaryti kontaktui tarp skersinio susiuvimo
liuciferazės kristalo ir terpės, turinčios (1)
analizuojamą medžiagą, kurią veikia liuciferazė,
arba (2) reakcijos, kurioje dalyvauja analizuojama
medžiaga, produkta.

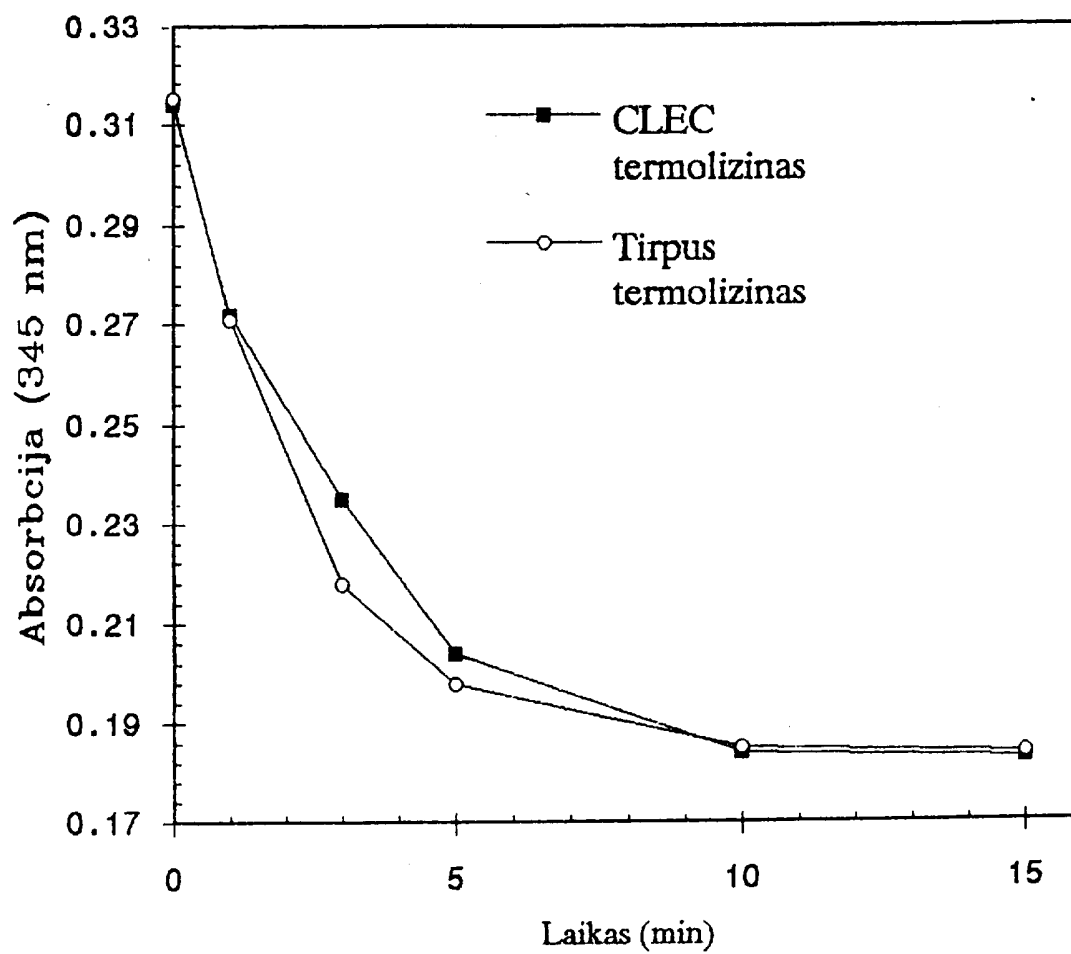
10 34. Ekstrakorporaliniis prietaisais terpės komponento
pakeitimui, b e s i s k i r i a n t i s t u o , k a d j i s
turi:

15 a) skersinio susiuvimo fermento kristalą pagal 3 arba
4 punktą, kuriame fermentas veikia komponentą arba
reagentą reakcijos, kurioje reagentas dalyvauja; ir

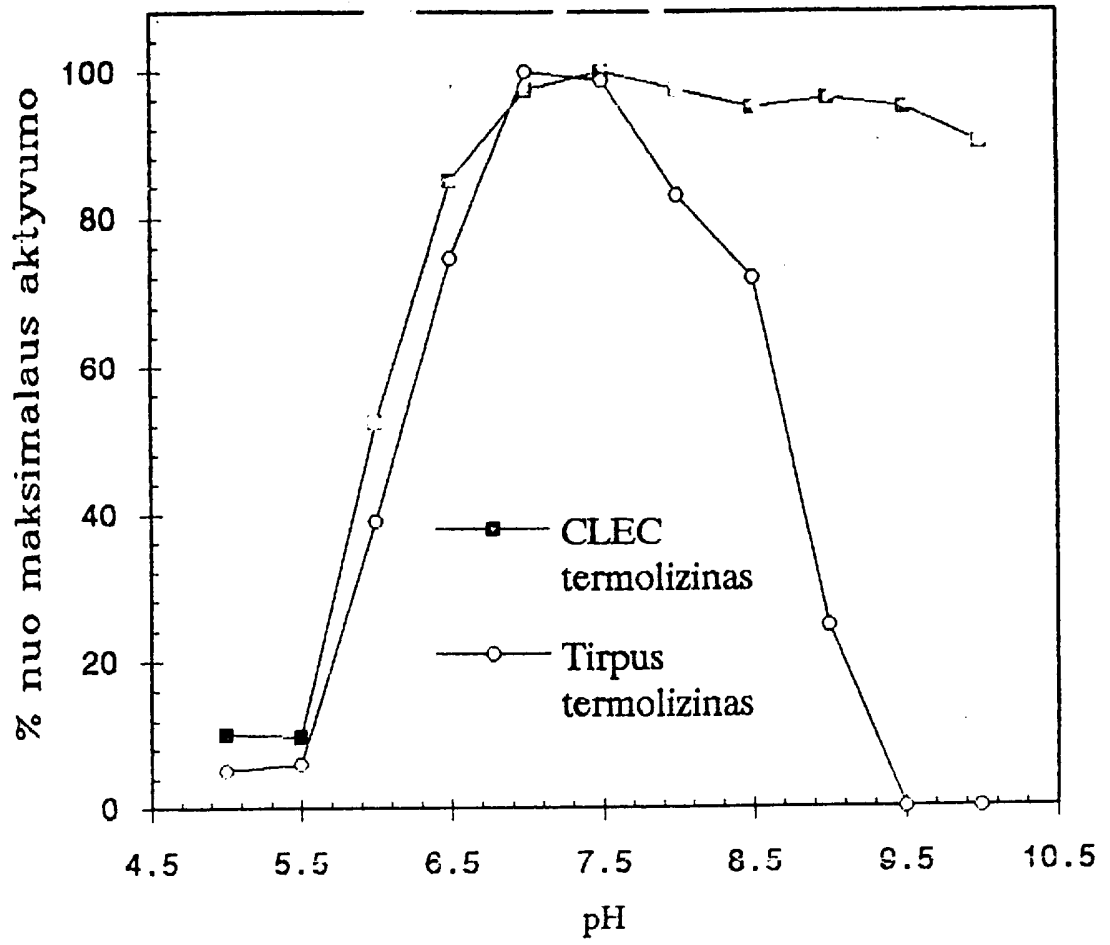
20 b) minimo skersinio susiuvimo fermento kristalo
išlaikymo priemonių, turinčių medžiagas, leidžian-
čias susidaryti kontaktui tarp skersinio susiuvimo
fermento kristalo ir (1) komponento, kuri veikia
fermentas, kai komponentas yra tokioje terpėje,
arba (2) reakcijos, kurioje dalyvauja komponentas,
produkto, kai reagentas yra terpėje.

25 35. Ekstrakorporialiniis prietaisais pagal 33 punktą,
b e s i s k i r i a n t i s t u o , k a d k o m p o n e n t a s y r a
asparaginas, heparinas, bilirubinas, metotreksatas,
aminorūgštys, karbamidas ir amoniakas.

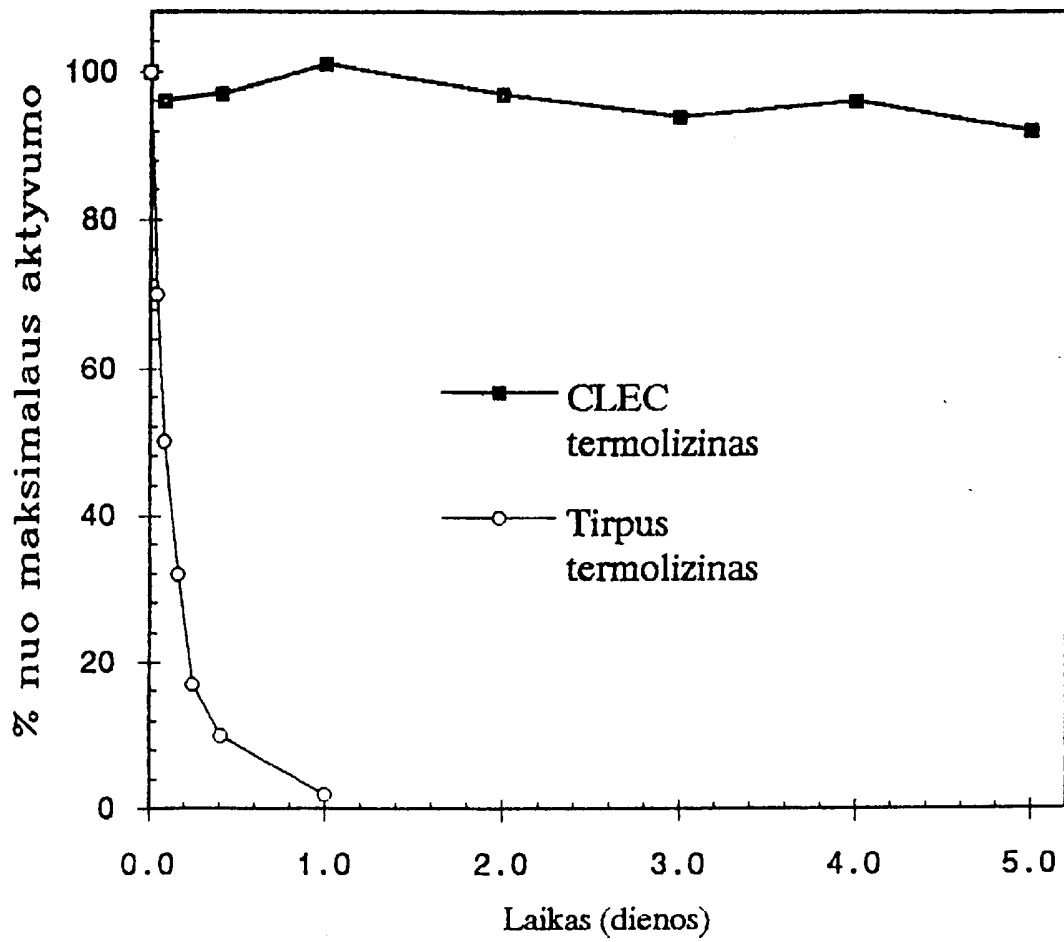
30 36. Prietaisais, skirtas panaudoti pasirinkto produkto
gamyboje, turintis fermentą skersinio susiuvimo
fermento kristalo formoje pagal 3 arba 4 punktą ir
skersinio susiuvimo fermento kristalui išlaikymo
priemonių.



PAV. 1

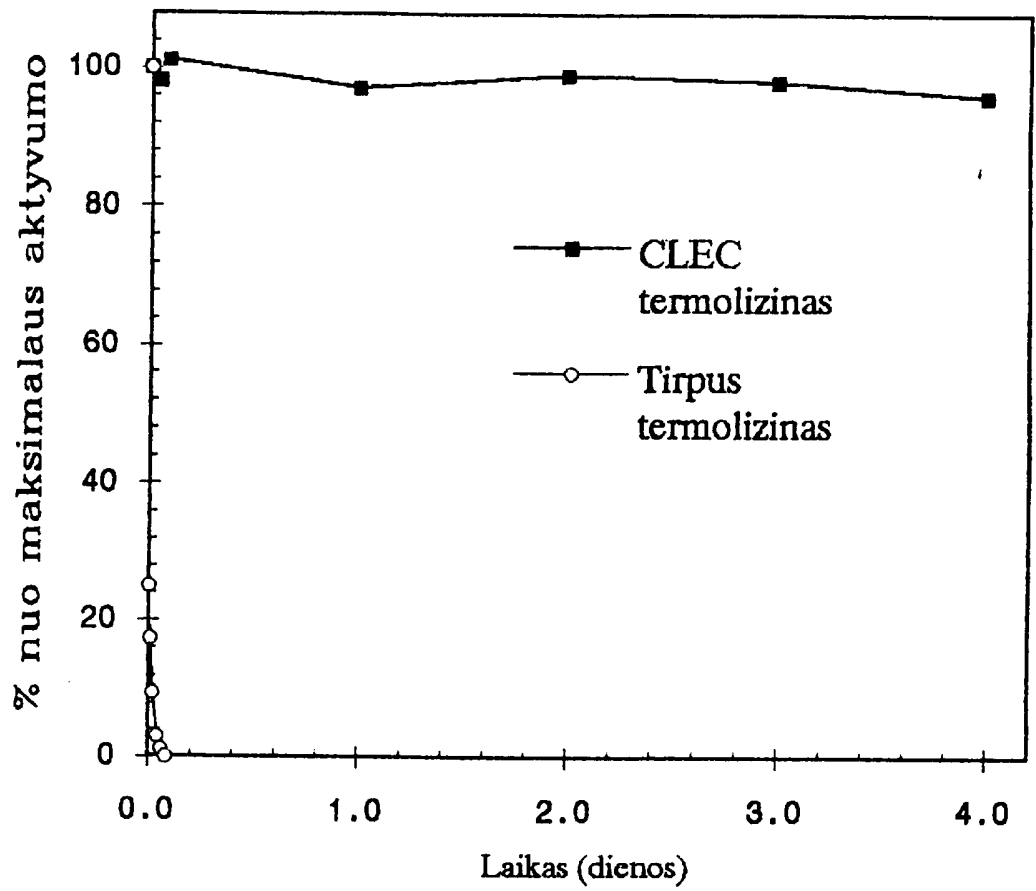


PAV. 2

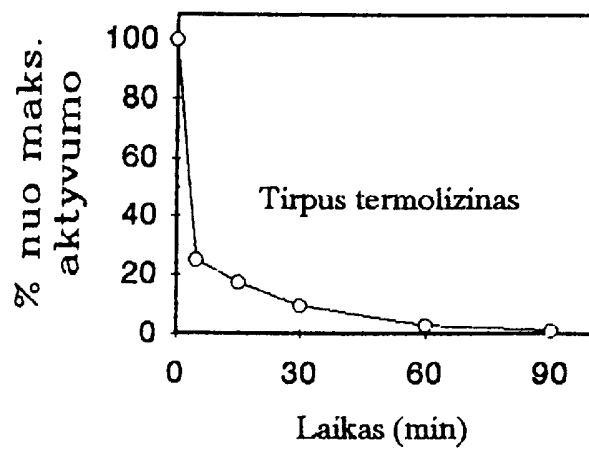


PAV. 3

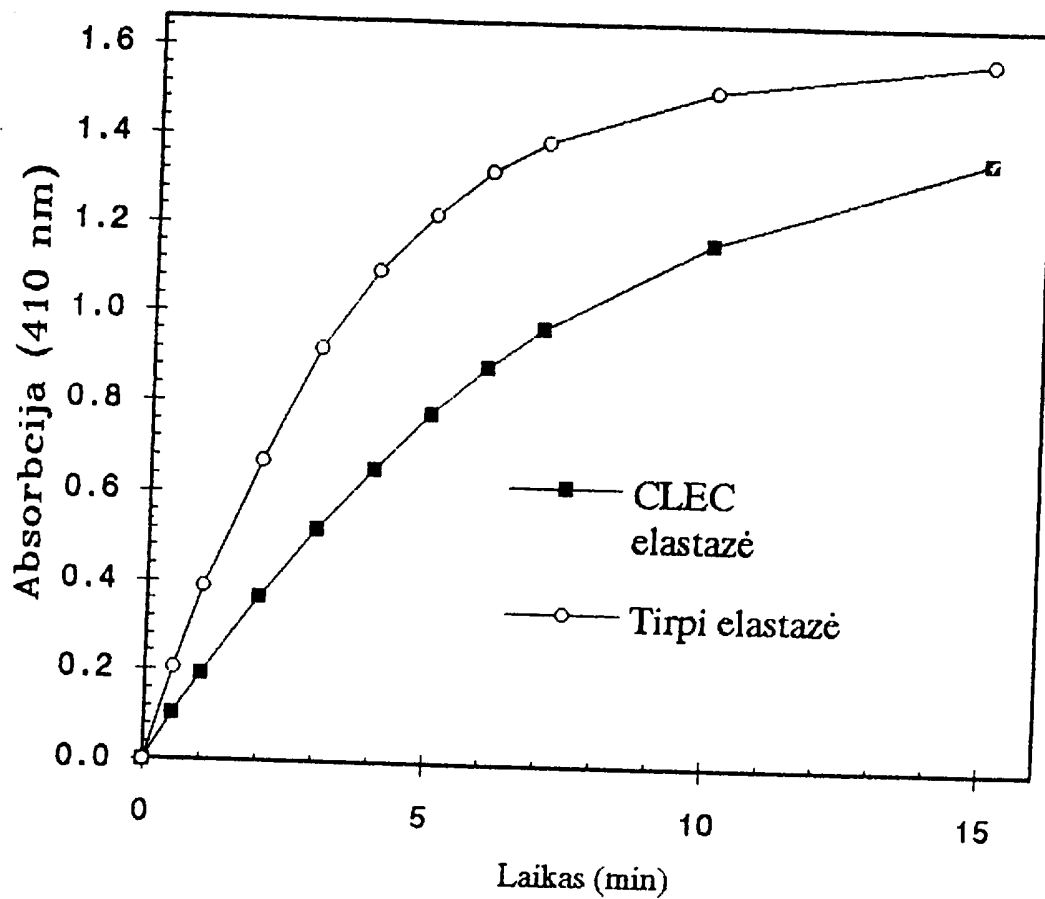
LT 3366 B



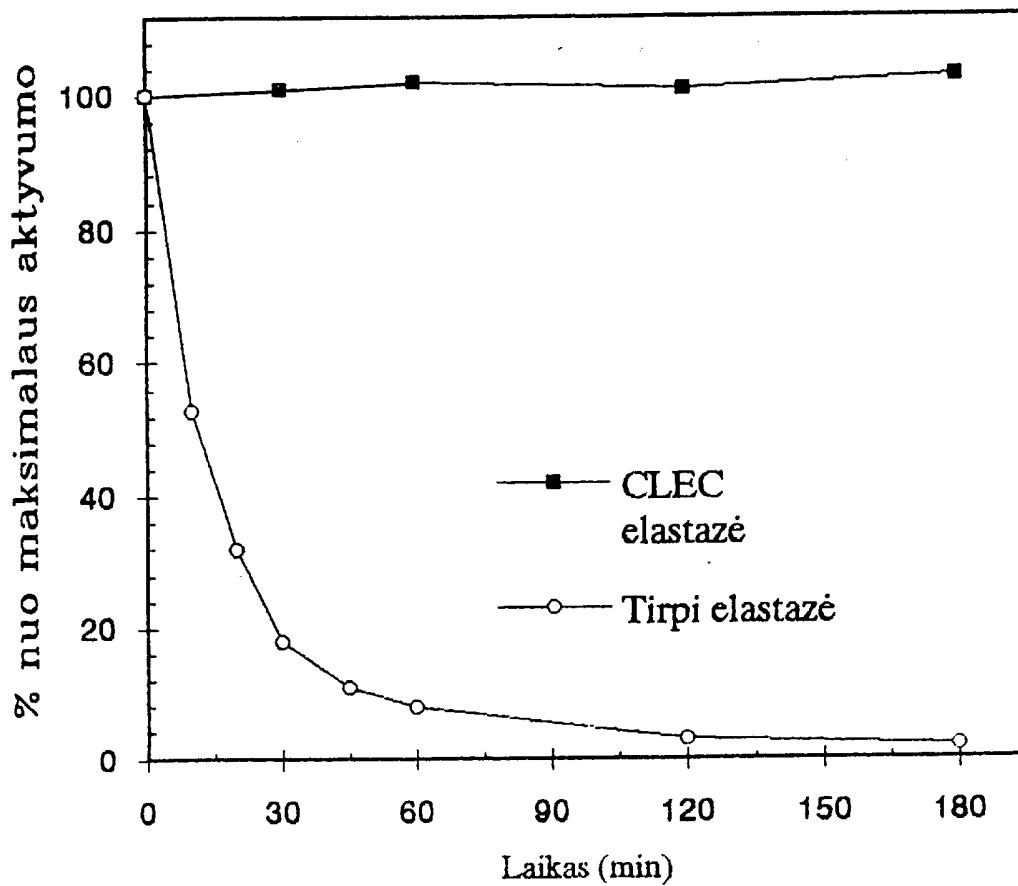
PAV. 4



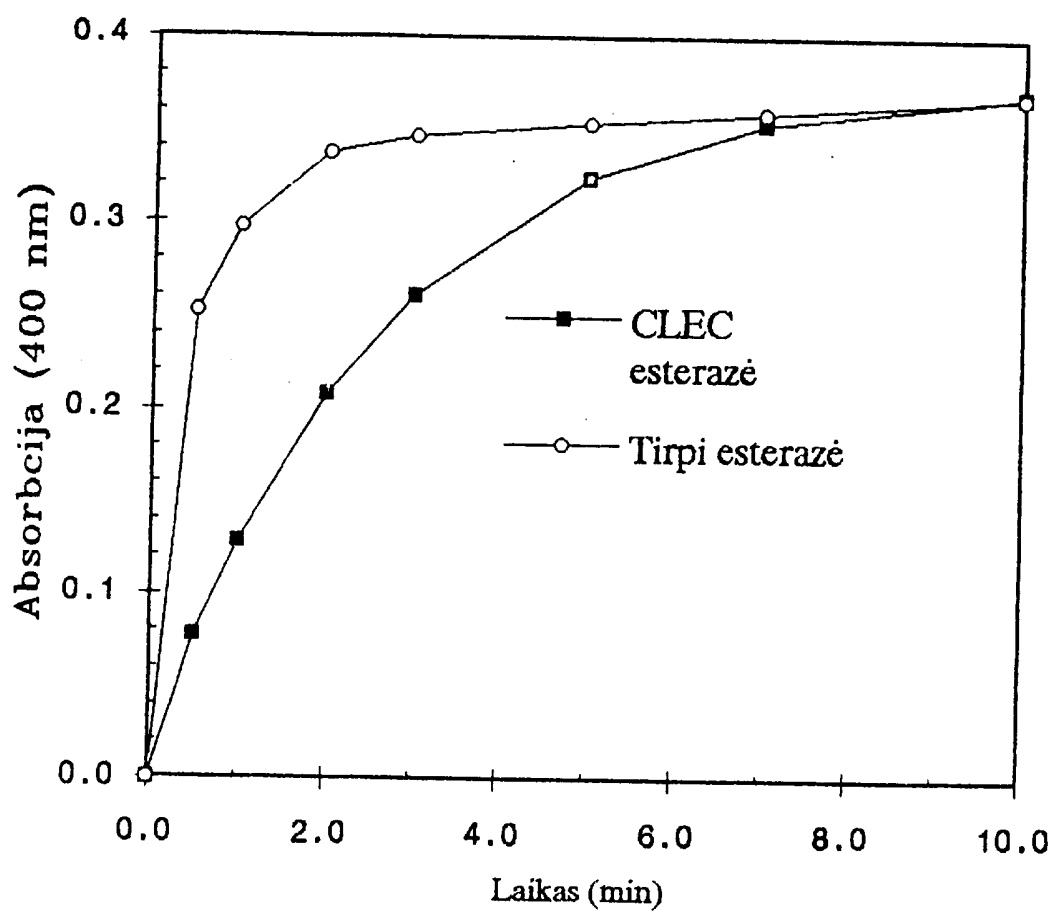
PAV. 4A



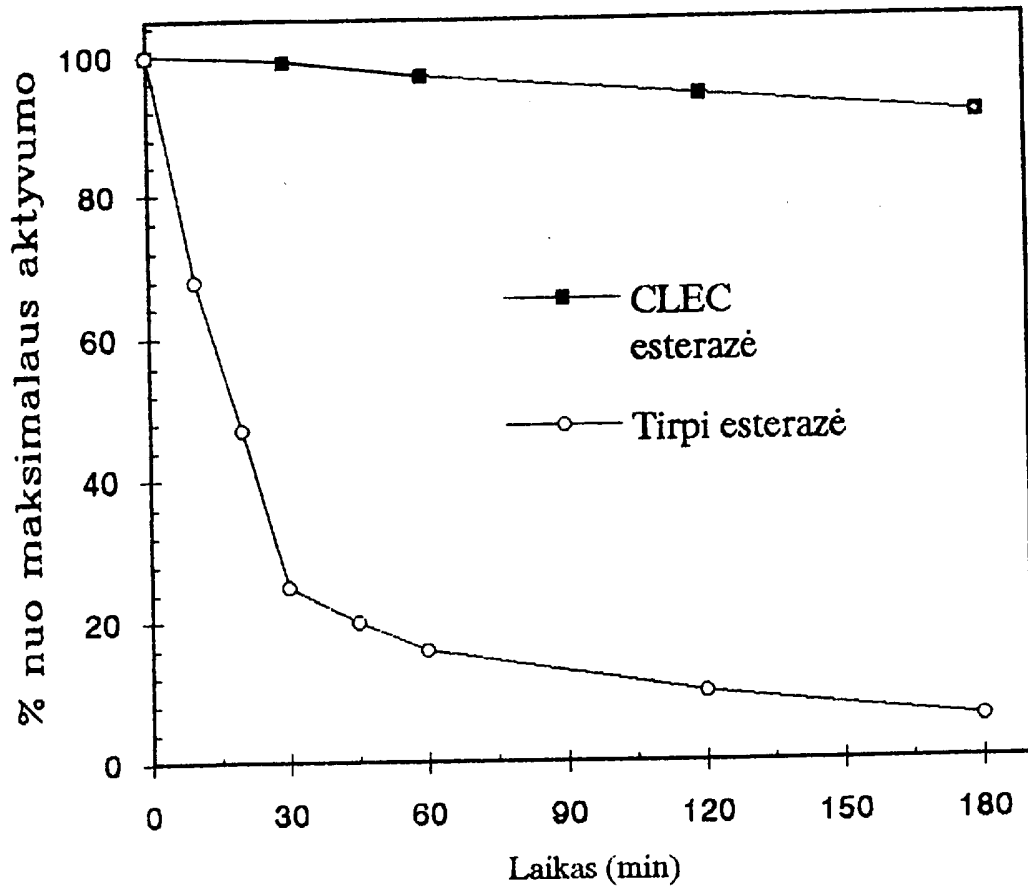
PAV. 5



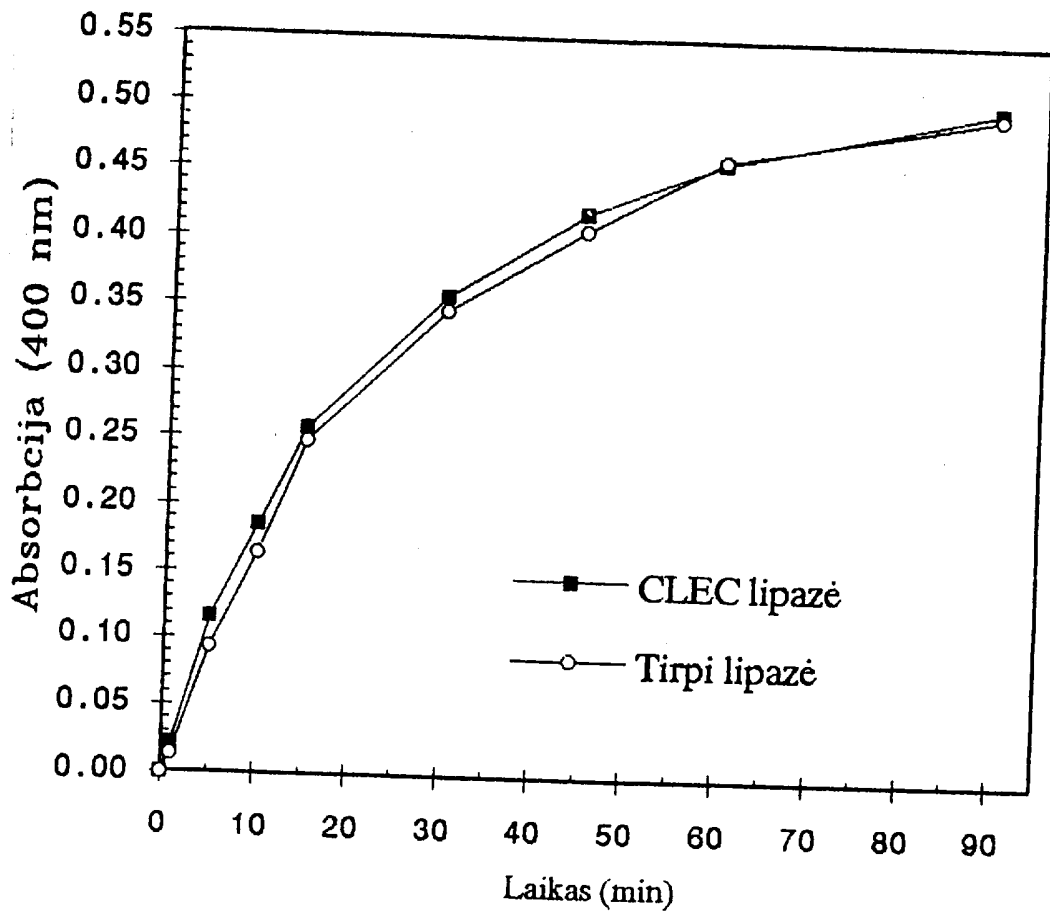
PAV. 6



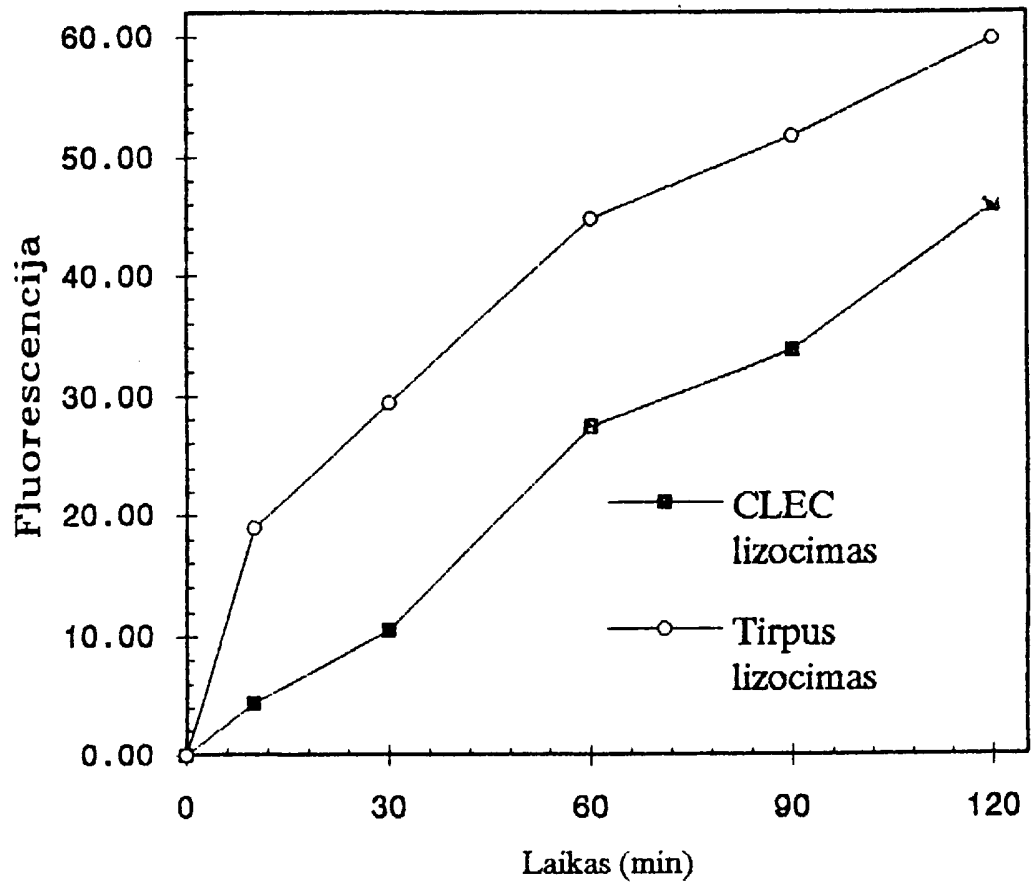
PAV. 7



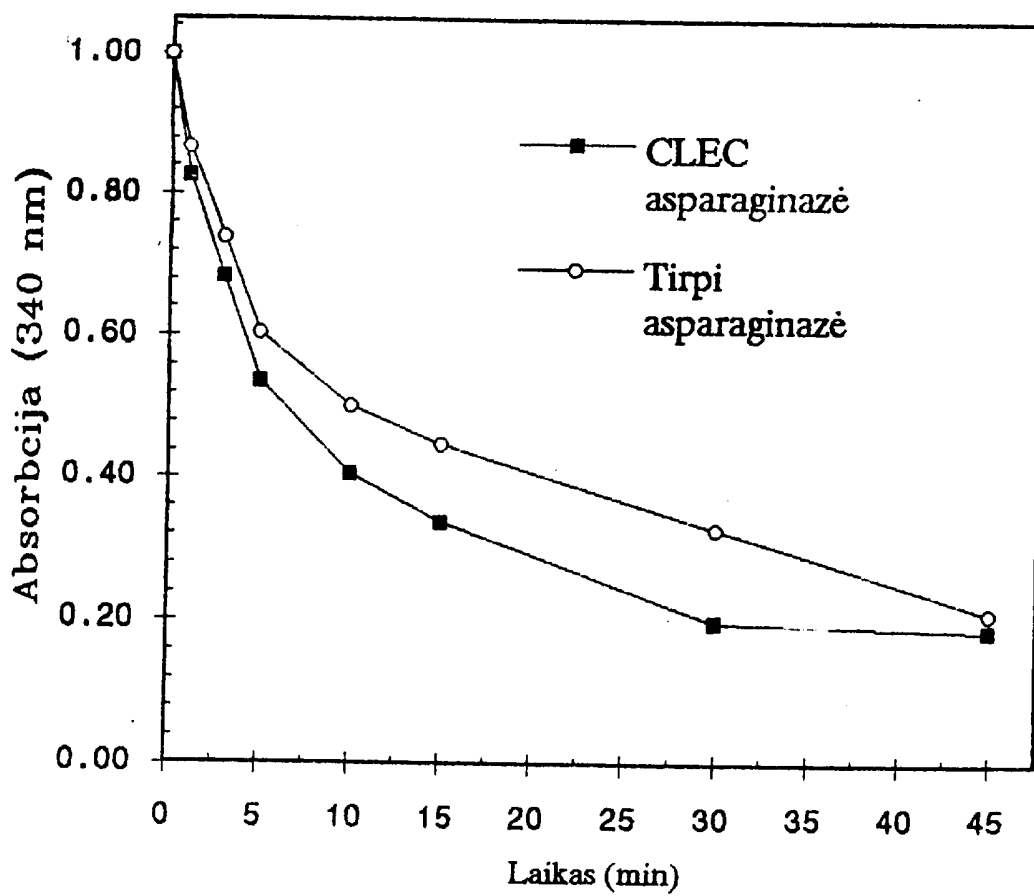
PAV. 8



PAV. 9



PAV. 10



PAV. 11