

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

230892
(11) (B1)

[22] Prihlášené 03 03 83
[21] (PV 1888-83)

[40] Zverejnené 30 12 83

[45] Vydané 15 11 86

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/14

[75]

Autor vynálezu

REXOVÁ-BENKOVÁ LUBOMÍRA RNDr. CSc., OMELKOVÁ JIŘINA ing.,
BRATISLAVA, VERUOVIČ BUDIMÍR ing. CSc., PRAHA,
KUBÁNEK VLADIMÍR doc. ing. CSc., KRALUPY nad Vltavou

(54) Spôsob prípravy imobilizovanej endopolygalakturonázy

1

2

Vynález sa týka spôsobu prípravy imobilizovanej endopolygalakturonázy. Podstata vynálezu spočíva v tom, že na nosič tvorený polymérnou látkou, napríklad na báze poly 2,6-dimetylfenylénoxidu, polykondenzátu melaninu s formaldehydom, alebo polyetylén-tereftalátu adsorbuje glutaraldehyd a na aktivovaný nosič sa pôsobí endopolygalakturonázou.

Vynález sa týká spôsobu prípravy imobilizovanej endopolygalakturonázy [poly(α -1,4-D-galacturonid) glyconahydrolase, E. C. 3.-2.1.15]. Tento enzým, ktorý katalyzuje štiepenie vnútorných glykozidických väzieb D-galakturonanových refazcov v molekule pektínu sa v praxi uplatňuje v potravinárskom priemysle, najmä v konzervárstve a vinárstve.

Endopolygalakturonázu imobilizovali dotiaľ kovalentným viazaním na nerozpustné nosiče na báze agarózy, celulózy a hydroxyalkyl metakrylátu po ich aktivácii brómkyanom, alebo na gél kyseliny polyakrylovej pomocou Karbodiimidu [F. van Houdenhoven, P. de Witt, J. Visser: Carbohyd. Res. 34 (1974) 233; W. Bock, M. Krause, H. Göbel, H. Anger, H. J. Schwaller, C. Flemming, A. Gabbert: Nahrung 22 (1979) 185; L. Rexová-Benková, M. Mračková, K. Babor: Collect. Czech. Chem. Commun. 45 (1980) 163]. Ďalším spôsobom imobilizácie endopolygalakturonázy je adsorpcia na polyetyléntereftalát [L. Rexová-Benková, J. Omelková, V. Kubánek: A. O. 211 694 (1981)]. Nevýhodou uvedených postupov použitých je operačná zložitosť aktivácie nosiča, v niektorých prípadoch nestálosť zakotvenia enzýmu na nosiči prejavujúca sa jeho postupným uvoľňovaním do roztoku a v prípade imobilizácie adsorpciou možnosť adsorbovania aj niektorých iných látok prítomných v enzýmových preparátoch alebo spracovávaných substrátoch, čím sa kapacita nosiča voči enzýmu alebo enzýmová aktivita znižujú.

Uvedené nedostatky sú odstránené u prípravy imobilizovanej endopolygalakturonázy podľa vynálezu, ktorého podstatou je, že sa na nosič tvorený polymérnou látkou, napríklad na báze poly(2,6-dimetylphenylénoxidu), polykondenzátu melaninu s formaldehydom, alebo polyetyléntereftalátu adsorbuje pri teplote 20 až 25 °C glutaraldehyd z 1 až 15 % vodného roztoku, aktivovaný polymérny nosič sa oddelí od vodného roztoku filtráciou, potom sa suspenduje v 0,1 mol l^{-1} tlmivom roztoku pH 5,0 až 6,0 a pôsobí sa naň endopolygalakturonázou pri teplote 4 až 30 °C po dobu 1 až 48 hodín a imobilizovaná endopolygalakturonáza sa nakoniec oddelí zo suspenzie filtráciou. Ďalej je v niektorých prípadoch výhodné, ak sa na polymérny nosič adsorbuje glutaraldehyd a na vzniklú kompozíciu sa viaže enzým a znovu sa zosieťuje glutaraldehydom.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy imobilizovanej endopolygalakturonázy oproti doterajším spôsobom je, že aktivácia nosiča umožňujúca kovalentné viazanie enzýmu je pri predmetnom spôsobe jednoduchšia, že zakotvenie enzýmu na nosiči je stálejšie, čo umožňuje dlhodobé kontinuálne používanie. Ďalšou výhodou preparátu pripraveného podľa tohoto spôsobu prípravy je, že nosič neadsorbuje substrát, ani väčšinu jeho sprievodných látok. Imobilizácia enzýmu na porézny polymérny sorbent podľa vynálezu

prebieha kombináciou prostej sorpcie a kovalentnej väzby. Aktivita pripraveného zakotveného enzýmu nie je natoľko negatívne ovplyvňovaná difúznou bariérou alebo ďalšími negatívnymi vplyvmi, ktoré sa prejavujú pri použití iných imobilizačných spôsobov.

Pre praktickú aplikáciu imobilizovaných enzýmov podľa vynálezu je rozhodujúce i to, že sa používajú vhodné a lacné nosiče, resp. sorbenty a jednoduchý spôsob imobilizácie. Polymerné sorbenty, resp. nosiče pre imobilizáciu enzýmu podľa vynálezu sa vyrábajú postupmi, ktoré spočívajú v tom, že sa polymér rozpustí v roztavenom rozpúšťadle a po ochladení na kryštalickú hmotu, ktorá sa podrobí ďalšiemu mechanickému spracovaniu sa tavné rozpúšťadlo dokonale vyextrahuje z polymérnej štruktúry extrakčným činidlom, ktoré rozpúšťa tavné rozpúšťadlo a neatakuje polymér. Získa sa polymér obvykle v práškovej forme s mikroporóznou štruktúrou a vysokým merným povrchom. Sorbent na báze poly(2,6-dimetyl)fenyloxidu sa pripravuje za použitia kaprolaktamu ako rozpúšťadla polyfenylenoxidu pri teplote 145 °C a extrakčné činidlá vody. Sorbent má pravidelnú mikroporéznu štruktúru a úzku distribúciu pórov so špecifickým povrchom okolo 700 m^2/g a bod topenia 252 °C.

Melaninformaldehydový sorbent sa pripravuje polykondenzáciou melaninu s formaldehydom za prítomnosti anorganických solí, ktoré sa zabudujú do polykondenzačného gélu a po jeho vytvrdení sa táto soľ vyextrahuje obvykle vodou. Tento sorbent má veľkosť zrna od 0,1 do 0,5 mm a merný povrch 200 m^2/g . Sorbent na báze polyetyléntereftalátu sa pripravuje prezráznením bezvodého polyetyléntereftalátu z taveniny niektorých cyklických monomérov, ktoré nerozpúšťajú východzí polymér. Tento sorbent má objem pórov 2 až 3 cm^3/g a špecifický povrch 50 až 120 m^2/g polyméru.

V ďalšom je vynález bližšie objasnený na príkladoch, ktoré však rozsah vynálezu neobmedzujú.

Príklad 1

1 g polyfenylénoxidového nosiča o mernom povrchu 560 m^2 per g sa postupne premyje 50 ml 72-%ného etylalkoholu a 3-krát 50 ml vody a suspenduje sa v 150 ml 5-%ného glutaraldehydu. Po 30 minútach miešania pri 20 °C sa suspenzia oddelí filtráciou cez fritu. Aktivovaný nosič sa suspenduje v 200 ml 0,1 mol l^{-1} octanového pufru pH 5,2 a k suspenzii sa pridá 10 mg endopolygalakturonázy rozpustenej v 1 ml pufru. Po 4 hodinách miešania pri laboratornej teplote sa imobilizovaný systém oddelí filtráciou cez fritu.

Príklad 2

1 g nosiča na báze polykondenzátu melaninu s formaldehydom o mernom povrchu

165 m²/g a strednom priemere pórov 11 nm sa suspenduje v 50 ml vody a k suspenzii sa pridá 150 ml 5-%ného roztoku glutaraldehydu a zmes sa mieša 2 hodiny pri 25 °C. Aktivovaný nosič sa odfiltruje a znovu sa suspenduje v 200 ml 0,1 mol l⁻¹ octanového pufru pH 6,0. K suspenzii sa potom pridá 10 mg endopolygalakturonázy rozpustenej v 1 ml roztoku pufru. Po 2 hodinách miešania sa suspenzia odfiltruje a získa sa imobilizovaný enzým.

Príklad 3

1 g polyetyléntereftalátového nosiča o mernom povrchu 120 m²/g sa premyje 50 ml vody a suspenduje sa v 150 ml 15 % glutaraldehydu. Po 15 minútach miešania pri 25 stupňov Celsia sa suspenzia oddelí filtráciou

cez fritu. Aktivovaný nosič sa suspenduje v 200 ml 0,1 mol l⁻¹ octanového pufru pH 6,0 a k suspenzii sa pridá 10 mg endopolygalakturonázy rozpustenej v 1 ml pufru. Po 2 hodinách miešania pri laboratornej teplote sa imobilizovaný enzým oddelí filtráciou cez fritu.

Aktivita imobilizovanej endopolygalakturonázy pripravenej podľa navrhovaného spôsobu prípravy tvorí 15 až 40 % aktivity rozpusteného enzýmu použitého k imobilizácii. Imobilizovaná endopolygalakturonáza pripravená podľa navrhovaného spôsobu prípravy sa vyznačuje vysokou stálosťou zakotvenia na nosiči a vysokou operačnou stabilitou prejavujúcou sa nemeniacou sa aktivitou v priebehu niekoľkomesačného sústavného používania.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy imobilizovanej endopolygalakturonázy, vyznačený tým, že sa na nosič tvorený polymérnou látkou, napríklad na báze poly(2,6-dimetylfenylénoxidu), polykondenzátu melamínu s formaldehydom, alebo polyetyléntereftalátu, ktorá má poréznu štruktúru so špecifickým povrchom 1 až 700 m²/g najskôr sorbuje pri teplote 20 až

25 °C glutaraldehyd z 1 až 15-%ného vodného roztoku, aktivovaný polymérny nosič sa oddelí od vodného roztoku filtráciou, potom sa suspenduje v tlmivom roztoku pH 5,0 až 6,0 a pôsobí sa naň endopolygalakturonázou pri teplote 4 až 30 °C po dobu 1 až 48 hodín a imobilizovaná endopolygalakturonáza sa potom oddelí zo suspenzie filtráciou.