



ÚRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

248499
(11) (B1)

[51] Int. Cl.⁴
C 12 N 9/04

[22] Prihlášené 08 11 85
[21] [PV 8059-85]

[40] Zverejnené 17 07 86

[45] Vydané 15 03 88

[75]

Autor vynálezu

ZEMEK JIŘÍ ing. CSc., LEHNICE, KUBAČKOVÁ MARTA ing. CSc.,
KUNIAK LUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA

[54] Spôsob stabilizácie enzýmu galaktózaoxidáza

1

2

Účelom uvedeného vynálezu je spôsob stabilizácie enzýmu galaktózaoxidáza (D-galaktóza: oxygen oxidoreduktáza, EC 1.1.3.9). Uvedeného účelu sa dosiahne tak, že enzým galaktózaoxidáza v roztoku fosfátového alebo tris(hydroxymetyl)metylamóniumchloridového ústojného roztoku o pH 6,5 až 8,0 o koncentrácii 0,01 až 0,05 mol. dm⁻³ sa nanesie na gél, pripravený zo sieťovaného alfa galaktanu, ako karagenanu alebo guaranu a získaný gél s enzýmom sa vysuší. Spôsob stabilizácie enzýmu galaktózaoxidáza má využitie v klinickej biochémii pri príprave diagnostiku určených k monitorovaniu metabolických porúch (galaktosémia, galaktosúria) v potravinárskej a veterinárnej analytike a vo výskume.

Vynález sa týka spôsobu stabilizácie enzýmu galaktózaoxidáza (D-galaktóza: oxygen-oxidoreduktáza, EC 1.1.3.9).

Galaktózaoxidáza je enzým zo skupiny metaloproteínov s atómom meďi v prostetickej skupine, ktorý katalyzuje oxidáciu primárnej hydroxylovej skupiny na uhlíku D-galaktózy v polohe 6 za vzniku aldehydickej funkcie. Táto oxidácia prebieha nie len v molekule voľnej D-galaktózy, ale aj v anhydrogalaktozylových jednotkách s touto voľnou hydroxylovou skupinou v oligo- a biopolyméroch.

Jedným z obecné využívaných postupov stabilizácie enzýmových aktivít je prídavok reakčného substrátu k roztoku enzýmu, zvýšenie hydrofóbnosti prostredia prídavkom organického rozpúšťadla alebo prídavkom niektorých mono- alebo disacharidov k roztoku enzýmu [N. Citri: Adv. Enzymol. 37, 397 (1937)].

Nevýhodou stabilizácie v roztoku je u väčšiny enzýmov a to predovšetkým zo skupiny transglykozylačných enzýmov a oxidoreduktáz nižšia schopnosť perzistencie aktivity pri teplotách nad 60 °C. Z toho dôvodu sa ukazuje ako účelná stabilizácia enzýmov na fázovom rozhraní, pripravenom z modifikovaného polymérneho substrátu [J. Zemek, Š. Bauer, E. Kuniak: Biopolymers 18, 2135 (1979)], alebo afinantov obecného typu [J. Zemek, E. Kuniak, P. Gemeiner, J. Zámocký, Š. Kučár: Enzyme Microb. Technol. 4, 223 (1982)], prípadne kompetitívnych inhibítorov reakcie, ktorí sa viažu na aktívne centrum enzýmu, v priebehu interakcie s enzýmom sa však nerozkladajú. Galaktózaoxidázu sa zatiaľ na fázovom rozhraní stabilizovať nepodarilo.

Uvedené nevýhody odstraňuje postup podľa vynálezu, podstata ktorého spočíva v tom, že enzým galaktózaoxidáza v roztoku fosfátového alebo tri(hydroxymetyl)metylamóniumchloridového ústojného roztoku o pH 6,5 až 8,0 a koncentrácií 0,01 až 0,05 mol. dm⁻³ sa nanesie na gél pripravený z alfa galaktánov ako je karagenan alebo guaran alebo ich zmesí sieťovaných bifunkčným činidlom 2-chlormetyloxyránom s výsledným napúšťacím objemom 4 až 10 cm³. g⁻¹ a stupeň sieťovania 0,02 až 0,1 a to tak, aby hmotnosť gélu k hmotnosti roztoku enzýmu boli v pomere 0,7 až 1 a mokrý gél sa nakoniec vysuší do teploty 40 °C.

Výhodou uvedeného postupu je jeho jednoduchosť, technická nenáročnosť, vysoká stabilita enzýmu počas skladovania, ako aj možnosť prípravy enzýmového preparátu v tabletovacej forme, priamym suchým tabletovaním enzýmu zakotveného na nosiči.

Príklad 1

Enzým galaktózaoxidáza z *Polyporus circinatus* o aktivite 2 μ kat a špecifickej aktivite 1,2 nkat. mg⁻¹ sa rozpustí v 10 cm³ fosfá-

tového ústojného roztoku o pH 6,5 a koncentrácii 0,01 mol. dm⁻³ 68,5 cm³ dihydrogenfosforečnanu sodného (27,8 g. dm⁻³) a 31,5 centimetrov krychlových hydrogenfosforečnanu sodného (53,65 g. dm⁻³), doplnené na 1 dm³ dest. vodou a nanesie na 10 g gélu, pripraveného z karagenanu, sieťovaného 2-chlormetyloxyránom na stupeň sieťovania 0,02 a napúšťacom objeme 10 cm³. g⁻¹. Získaný gél sieťovaného karagenanu s galaktózaoxidázou sa vysuší pri tlaku 5 kPa a podrobí tepelne expozičným testom pri teplote 70 až 90 °C. Zatiaľ, čo lyofilizovaný enzýmový preparát sa dezaktivoval už po 3 dňovej expozícii pri teplote 70 °C, enzým stabilizovaný na povrchu gélu sieťovaného karagenanu zaznamenal po 3 dňoch expozície pri teplote 90 °C len 18 % pokles aktivity.

Príklad 2

Enzým galaktózaoxidáza z *Dactylium dendroides* o aktivite 1,4 μ kat a špecifickej aktivite 0,95 nkat. mg⁻¹ sa rozpustí v 25 cm³ tris(hydroxymetyl)metylamóniumchloridového ústojného roztoku o koncentrácii 0,05 mol. dm⁻³ 50 cm³ roztoku tris(hydroxymetyl)metylamínu (24,2 g. dm⁻³ kyseliny chlorovodíkovej sa doplní vodou do 200 cm³ a nanesie sa na 50 g gélu pripraveného z guaranu, sieťovaného 2-chlormetyloxyránom na stupeň sieťovania 0,1 a o napúšťacom objeme 4 cm³. g⁻¹. Získaný gél s enzýmom sa vysuší voľne a podrobí tepelne expozičným testom pri teplote 70 až 90 °C. Zatiaľ, čo lyofilizovaný enzýmový preparát sa dezaktivoval už po 3 dňovej expozícii pri teplote 70 °C, enzým stabilizovaný na povrchu gélu sieťovaného garagenanu zaznamenal po 3 dňoch expozície pri teplote 90 °C len 18 % pokles aktivity.

Príklad 3

Postupuje sa podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že sa roztok enzýmu nanáša na gél pripravený zo smesi karagenanu a guaranu v hmotnostných pomeroch 1 : 1 a sieťovaný 2-chlormetyloxyránom na stupeň sieťovania 0,05 a o napúšťacom objeme 7 cm³. g⁻¹. Zatiaľ, čo lyofilizovaný enzýmový preparát sa dezaktivoval už po 3 dňovej expozícii pri teplote 70 °C, enzým stabilizovaný na povrchu gélu zo zmesi sieťovaného karagenanu a guaranu zaznamenal po 3 dňoch expozície pri teplote 90 °C iba 18 % pokles aktivity.

Vynález môže nájsť široké uplatnenie pri stabilizácii enzýmu galaktózaoxidáza pri výrobe diagnostík pre účely klinickej biochémie, napr. pri monitorovaní galaktosémie a galaktosúrie, k štruktúrnej analýze oligosacharidov a biopolymérov, v potravinárskej a veterinárnej analytike a vo výskume.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob stabilizácie enzýmu galaktózaoxidáza EC 1.1.9.9 vyznačený tým, že enzým galaktózaoxidáza v roztoku fosfátového alebo tris(hydroxymetyl)metylamóniumchloridového ústojného roztoku o pH 6,5 až 8,0 a koncentrácii 0,01 až 0,05 mol. dm⁻³ sa nanesie na gél pripravený z alfa galaktánov ako je karagenan alebo guaran alebo ich

zmesí sieťovaných bifunkčným činidlom 2-chlormetyloxyránom na stupeň sieťovania 0,02 až 0,1 s výsledným napúšťacím objemom 4 až 10 cm³. g⁻¹ tak, aby hmotnosť gélu k hmotnosti roztoku enzýmu boli v pomere 0,7 až 1,0 a mokrý gél sa nakoniec vysuší do teploty 40 °C.