



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

206060

(11)

(B1)

(22) Přihlášeno 06 07 79

(21) (PV 4785-79)

(40) Zveřejněno 29 08 80

(45) Vydáno 02 05 84

(51) Int. Cl.³

C 42 N 11/00

(75)

Autor vynálezu

LASOVSKÝ JAN RNDr. CSc., PROSTĚJOV
a GRAMBAL FRANTIŠEK ing., OLOMOUC

(54) Způsob imobilizace a separace enzymů

Vynález se týká způsobu imobilizace a separace enzymů.

Současná mikrobiologie a biochemie umožňují získat enzymy pro různorodé reakce, významné i pro národní hospodářství. Jejich rozšíření doposud brání velká cena a malá dostupnost některých enzymů, malá tepelná odolnost a nemožnost opakovaného použití. V posledních letech jsou tyto nedostatky dílem odstraňovány použitím tzv. imobilizovaných enzymů, tj. enzymů uměle svázaných s nerozpustným nosičem. Takto upravené enzymy jsou odolnější vůči vnějším podmínkám, reakce je možné heterogenizovat, případně enzym vydělit a opakovaně použít. Přípravu ve vodě nerozpustných, imobilizovaných enzymů lze uskutečnit několika způsoby (viz Kotyk A., Horák J.: Enzymová kinetika, Academia, Praha 1977).

Jedním z nich je adsorpce na inertních nosičích, nebo iontoměničích. Tento způsob má několik nevýhod, které ho znehodnocují oproti jiným metodám imobilizace. Velké koncentrace solí i substrátu enzym desorbují a je obtížné se vyhnout úniku enzymu.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob imobilizace a separace enzymů podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se enzym adsorbuje na pevný nosič za přítomnosti 10^{-3} až 10^{-2} mol l^{-1} kationoidního tenzidu.

Jako kationoidního tenzidu je možné s výhodou použít N-(α -karbethoxypentadecyl)-trimethylamoniumbromid nebo cetyltrimethylamoniumbromid.

Na enzym se působí iontovým tenzidem, který má povahu protiiontu, vznikne iontový asociát enzym–tenzid, který se adsorbuje na pevný nerozpustný nosič. Imobilizaci je možné provádět také tak, že se na pevný nosič naadsorbuje tenzid, načež se na něj působí roztokem enzymu.

Při adsorpci iontových sloučenin je rozhodující jejich náboj a povrchový náboj nosiče. Anorganické nosiče na bázi oxidu křemičitého, kyseliny křemičité, křemičitanů a aluminosilikátů jako jsou silikagel, kaolinit a podobně, mají záporný povrchový náboj. Je-li požadována adsorpce enzymu, který při daných podmínkách existuje v roztoku ve formě aniontu, je vhodné repulsi souhlasných nábojů adsorbentu a adsorbátu odstranit přidávkou kationoidního tenzidu. Tento způsob adsorbce je velmi účinný. Při jeho aplikaci je možné použít všech běžných kationoidních tenzidů, například cetyltrimethylamoniumbromidu, N-(α -kar-

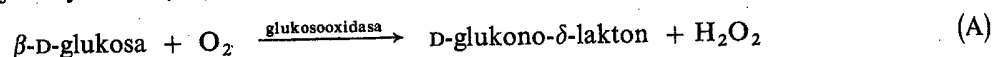
bethoxypentadecyl)-trimethyl-amoniumbromidu (septonex) a podobně. Kombinací nosičů tenzidů a volbou pH je možné adsorpci enzymů výrazně ovlivnit, což může mít význam pro separaci a izolaci enzymů. Výhodou způsobu podle vynálezu je jednoduchost přípravy imobilizovaných enzymů, která se může uplatnit při přípravě multienzymových systémů.

Způsob imobilizace enzymů je blíže objasněn v následujících příkladech.

Příklad 1

Imobilizace glukosooxidasy cetyltrimethylamoniumbromidem (CTAB) na silikagel.

Glukosooxidasa je enzym katalyzující oxidaci glukosy (A).



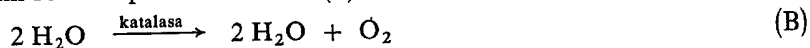
Isoelektrický bod pI má hodnotu 4,3 a při pH 7 existuje enzym výlučně ve formě aniontu. Z micelárního prostředí cetyltrimethylamoniumbromidu je možné iontový asociát enzym/CTAB adsorbovat na silikagel.

Ke 4 g silikagelu bylo přidáno 20 ml roztoku enzymu (koncentrace 1,3 mg bílkoviny/ml, aktivita 20 I.U./mg bílkoviny), 20 ml 10^{-2} mol l^{-1} roztoku CTAB, resp. 20 ml vody. Oba vzorky byly po dobu 8 hodin promíchávány, pevná fáze oddělena centrifugováním (0,5 hodiny při 3000 ot. min^{-1}) a v čirém roztoku bylo spektrofotometricky stanoveno množství enzymu. Za přítomnosti CTAB proběhla adsorpce z 83 %, ve vodném roztoku pouze ze 17 %. K enzymu, resp. iontovému asociátu enzym/tenzid adsorbovaným na silikagel bylo přidáno 600 ml vody, intenzivně hodinu mícháno a po sedimentaci byly suspenze dekantovány. K oběma vzorkům imobilizovaných enzymů bylo přidáno 5 ml fosfátového ústoje (pH 7,30) a 10 ml roztoku glukosy (500 mg/100 ml). Po 1,5hodinovém míchání při 20 °C byly imobilizované enzymy odděleny centrifugováním a stanovena aktivita enzymu. Oddělené imobilizované enzymy byly 15 minut promíchávány se 600 ml vody a po sedimentaci dekantovány. Po přidání fosfátového pufru a roztoku glukózy bylo možné opakovaně sledovat aktivitu imobilizovaných enzymů. Tento cyklus byl opakován 6 ×. Aktivita enzymu imobilizovaného pomocí cetyltrimethylamoniumbromidu byla v průměru 11 × větší.

Příklad 2

Imobilizace katalasy cetyltrimethylamoniumbromidem na silikagel.

Katalasa je enzymem katalyzujícím rozklad peroxidu vodíku (B).



Enzym se vyznačuje mimořádně vysokou aktivitou a jeho účinek není snižován přítomností cetyltrimethylamoniumbromidu.

Ke 4 g silikagelu bylo přidáno 10 ml suspenze katalasy (koncentrace 0,217 mg bílkoviny/ml, aktivita 2000 I.U./mg bílkoviny), 10 ml 10^{-2} mol l^{-1} CTAB, resp. 10 ml vody. Po 5 hodinách míchání byly imobilizované enzymy odděleny a dvakrát po dobu 30 minut promývány 600 ml vody. K oběma vzorkům enzymu imobilizovaných na silikagel bylo přidáno 10 ml fosfátového ústoje (pH 7,38) a 10 ml 3% H_2O_2 . Při 20 °C byly vzorky 10 minut míchány a po dalších 5 minutách byl u každého vzorku odebrán 1 ml do 10 ml 4N- H_2SO_4 . Nerozložený peroxid vodíku byl stanoven manganimetricky. Imobilizované enzymy promyté vodou bylo možné opakovaně použít. Enzym imobilizovaný pomocí CTAB vykazuje větší účinnost (Tab. 1).

Tabulka 1
Aktivita katalasy imobilizované na silikagel
% vyreagování H_2O_2

	1. pokus	2. pokus	3. pokus
imobilizace pomocí CTAB	100	92,6	47,6
imobilizace z vodného prostředí	68,5	24,6	24,3

U tohoto enzymu se však po adsorpci zachovává pouze 1% aktivity nativního enzymu. Nedokonalá adsorpce navíc způsobuje, že aktivita enzymu při opakovaném použití klesá (Tab. 1). Přítomnost katalasy v prodejnách vzorcích glukosooxidasy způsobuje, že stanovení aktivity enzymu pomocí analýzy peroxidu vodíku je nejisté. Po jednorázovém vymytí glukosooxidasy imobilisované prostřednictvím cetyltrimethylamoniumbromidu na silikagel (15 mg bílkoviny/4 g silikagelu) 600 ml vody se po oxidaci glukosy zvyší

množství uvolněného peroxidu vodíku $5 \times$. Navržený způsob adsorpce pomocí CTAB je tedy použitelný i pro dělení enzymů.

Adsorpce enzymů a jiných látek pomocí navrženého způsobu může dále sloužit k úpravě povrchu nosičů pro chromatografické separační metody, například pro afinitní chromatografii a podobně.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob imobilizace a separace enzymů, vyznačený tím, že se enzym adsorbuje na pevný nosič za přítomnosti 10^{-3} až 10^{-2} mol l^{-1} kationoidního tenzidu.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se jako kationoidní tenzid použije N-(α -karbethoxypentadecyl)-trimethylamoniumbromid.
3. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se jako kationoidní tenzid použije cetyltrimethylamoniumbromid.