

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

O P I S P A T E N T O W Y 100715

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 19.03.76 (P. 188114)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 10.10.77

Opis patentowy opublikowano: 15.02.1979

Int. Cl.² C07G 7/02

CZYTELNIA

Instytut Patentowy
ul. Długa 15
00-211 Warszawa

Twórcy wynalazku: Ireneusz Janczarski, Eugeniusz Lubaszka, Andrzej Mazur,
Krzysztof Witkowski

Uprawniony z patentu: Akademia Medyczna,
Warszawa (Polska)

Sposób otrzymywania aktywnych nierozpuszczalnych enzymów

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania aktywnych nierozpuszczalnych enzymów, nadających się do wielokrotnego użycia oraz do regenerowania ze środowiska reakcji.

Enzymy są nietrwałymi substancjami białkowymi o charakterze koloidów. Istnieją trudności przy otrzymywaniu czystych preparatów enzymatycznych, związane zarówno z własnościami fizykochemicznymi enzymów, jak również z utratą ich aktywności w procesie izolowania z materiału biologicznego. Wysokie koszty otrzymania oraz labilność chemiczna ograniczają stosowanie enzymów w celach analitycznych, a zwłaszcza w procesach technologicznych. Istnieje więc potrzeba modyfikowania naturalnych własności enzymów w kierunku wiązania ich ze stałym podłożem dla lepszego wykorzystania aktywności biologicznej zarówno w zastosowaniach przemysłowych, jak i laboratoryjnych.

Znane są już niektóre sposoby otrzymywania nierozpuszczalnych enzymów. Esteraza cholinowa jest inkludowana w żelu skrobiowym i łączona za pomocą wiązania kowalentnego z sefarozą, zaś ureaza z żelalem poliakryloamidowym. Wykorzystywane są też w stanie nierozpuszczalnym takie enzymy, jak amylaza lub fosfataza. Jednakże te znane nierozpuszczalne enzymy wykazują znacznie obniżoną aktywność biokatalityczną oraz znacznie skrócony okres trwałości w stosunku do czystych preparatów naturalnych enzymów. Inkludowana inwertaza w żelu poliakryloamidowym zachowuje około 69,2%, glukoamylaza zaledwie 6,5%, obojętna proteaza 10,5% aktywności enzymu, użytego do inkludowania. Nierozpuszczalne preparaty nierozpuszczalnych enzymów tracą aktywność przy próbach wiązania ich ze stałym podłożem i w krótkim okresie czasu przestają spełniać rolę biokatalizatorów. Używany najczęściej do wiązania żel poliakryloamidowy powoduje, w zależności od rodzaju enzymu, jego dezaktywację, dochodzącą nawet do 100%, głównie w procesie polimeryzacji monomeru.

Wynalazek ma na celu opracowanie takiego sposobu otrzymywania nierozpuszczalnych enzymów, związanych trwale z podłożem stałym, przy którym byłaby zachowana aktywność naturalnego biokatalizatora, bez uwalniania wolnego enzymu w czasie prowadzenia procesów biochemicznych. Dalszym celem wynalazku jest umożliwienie wielokrotnego stosowania enzymów bez strat ich biologicznej aktywności z równoczesnym umożliwieniem wielokrotnej regeneracji ze środowiska reakcji.

Istota sposobu według wynalazku polega na inkludowaniu w żelu krzemionkowym, otrzymywanym przez łagodną hydrolizę wodnego roztworu odpowiedniego estru krzemoorganicznego, zmieszanego uprzednio z roztworem enzymu. Najlepsze efekty uzyskuje się przy zastosowaniu III-rzędowych lub IV-rzędowych chlorków alkilowanych aminoalkoksylanów, jak również estrów kwasu krzemowego z glikolami. Wodne roztwory enzymu oraz związku krzemoorganicznego miesza się i doprowadza pH roztworu do wartości 7,0–7,5. Następnie do galaretowatego żelu dodaje się obojętnego wypełniacza, takiego jak skrobia, sefadeks sproszkowane tworzywo sztuczne itp. Opisane substancje miesza się dokładnie. Tak otrzymana masa jest przesączalna dla roztworu substratu i dla produktów reakcji. Sposób wiązania enzymów według wynalazku nie wymaga zachowania ostrych warunków i umożliwia wiązanie nawet tak delikatnego enzymu, jak acetylocholinoesteraza.

Wynalazek jest dokładniej objaśniony na przykładach.

Przykład I. 10 mg enzymu acetylocholinoesterazy rozpuszcza się w 0,5 cm³ wody redestylowanej, a następnie dodaje 0,5 g rozpuszczalnej soli estru krzemoorganicznego, korzystnie chlorowodoru dwuetyloaminoksyłanu. Po doprowadzeniu roztworu do wartości pH = 7,5 otrzymuje się żel, który rozdrabnia się i miesza z 0,5 g sefadeksu. Uzyskaną półpłynną masę przenosi się do kolumnienki szklanej o średnicy 3 cm, wysokości 5 cm. Po dokładnym wymyciu reszty organicznej związku krzemoorganicznego, który inhibuje odwracalnie aktywność acetylocholinoesterazy, przez kolumnę przepuszcza się roztwór chlorku acetylocholiny. Aktywność enzymu w zależności od stężenia substratu można mierzyć ilościowo notując przy pomocy wskaźnika lub pehametru zmianę pH wycieku w funkcji czasu. Tak przygotowany nierozpuszczalny enzym zachowuje aktywność w ciągu tygodnia.

Przykład II. 20 mg enzymu ureazy i 0,5 g soli estru krzemoorganicznego, korzystnie chlorku trójetyloaminopropylkoksylanu, rozpuszcza się w 0,5 cm³ wody redestylowanej. Otrzymany roztwór zobojętnia się do pH = 7 i otrzymany żel miesza się dokładnie z 3 do 5 g skrobi. Uzyskaną jednorodną masę przenosi się do kolumnienki szklanej, jak w przykładzie I. W przypadku ureazy produkt hydrolizy estru krzemoorganicznego nie inhibuje aktywności enzymu. Po podaniu roztworu substratu, korzystnie mocznika, w wycieku obserwuje się skutek powstającego amoniaku zmianę pH. Zmiana ta jest miarą aktywności ureazy. Inkludowana na żelu krzemionkowym ureaza hydrolizuje w ciągu trzech tygodni.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania aktywnych nierozpuszczalnych enzymów, z n a m i e n n y t y m, że wodny roztwór enzymu miesza się z wodnym roztworem związku krzemoorganicznego, stanowiącego estrowe pochodne glikoli lub alkilowanych aminoalkoholi i kwasu krzemowego, a otrzymaną mieszaninę poddaje się łagodnej hydrolizie, po czym do otrzymanego żelu dodaje się obojętny wypełniacz i dokładnie miesza, uzyskując masę przepuszczalną dla roztworów substratów.