ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA
(19)

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

263186

(11) (B1)

(51) Int. Cl.[4]
C 12 N 9/14

(22) Prihlásené 21 11 86
(21) PV 8469-86.Q

(40) Zverejnené 16 09 88

(45) Vydané 14 07 89

(75)
Autor vynálezu HEINRICHOVÁ KVETA ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy imobilizovanej D-galakturonandigalakturonohydrolázy

Riešenie sa týka spôsobu prípravy imobilizovanej D-galakturonandigalakturonohydrolázy. Podstata tohto riešenia spočíva v tom, že sa enzým zakotví pri pH 6,6 až 7,4 a teplote 4 až 25 °C na polymérnu látku akrylamidového typu s karboxylovými funkčnými skupinami. Riešenie má použitie všade tam, kde ide o pozvoľný rozpad pektínových látok. Najefektívnejšie je jeho využitie ku príprave kyseliny digalakturónovej na svetovom trhu v súčasnosti nedostupnej.

Vynález sa týka spôsobu prípravy imobilizovanej D-galakturonandigalakturonohydrolázy (poly-1-4-D-galactosiduronate digalacturonohydrolase E. C. 3.2.82), ktorá špecificky katalyzuje štiepenie koncových glykozidických väzieb D-galakturonanových reťazcov v molekulách pektínových látok za tvorby jediného produktu reakcie - kyseliny digalakturónovej Di-(D--galactoside uronic acid).

D-galakturonandigalakturonohydroláza nebola doteraz pripravená v pútanej forme postupom imobilizácie na nerozpustný nosič. Podstata vynálezu spočíva v tom, že sa enzým zakotví kovalentnou väzbou pri pH 6,6 až 7,4 a teplote 4 až 25 °C, na polymérnu látku akrylamidového typu s výhodou na mikroporézny polyakrylamidový nosič obsahujúci voľné karboxylové funkčné skupiny. Výhodou postupu prípravy imobilizovaného enzýmu podľa vynálezu je zvýšenie jeho stability pri dlhodobom skladovaní enzýmu, ďalej zvýšenie jeho operačnej a teplotnej stability. Uvedené vlastnosti D-galakturonandigalakturonohydrolázy zabezpečuje príprava imobilizovanej D-galakturonandigalakturonohydrolázy podľa vynálezu. Základný účinok spôsobu prípravy imobilizovanej D-galakturonandigalakturonohydrolázy spočíva v operačnej jednoduchosti postupu a stálosti zakotvenia, čo pri dodržiavaní optimálnych podmienok enzýmovej reakcie umožňuje používať imobilizovaný enzým opakovane, alebo v dlhodobých kontinuálnych procesoch. Ďalšou veľkou výhodou preparátu pripraveného podľa vynálezu je, že spôsob účinku na polymérne a oligomérne substráty je optori voľnému enzýmu nezmenený. Aktivita imobilizovanej D-galakturonandigalakturonázy pri degradácii glykozidických väzieb polymérneho substrátu vykazovala 23,8 % a pri degradácii oligomérnych substrátov až 80 % z aktivity voľného enzýmu.

Spôsob prípravy podľa vynálezu je vysvetlený na nasledujúcich príkladoch.

P r í k l a d 1

D-galakturonandigalakturonohydroláza produkovaná baktériami, izolovaná lubovoľným postupom napr. gélovou alebo iónovou chromatografiou, alebo ich kombináciou: Agr. Biol. Chem. 33, 116 (1969); Ber. Ohara. Inst. Landwirt. Biol. Okyama Univ. 15, 47 (1971); J. Gen. Microbiol. 132, (1986) v tlači, bola imobilizovaná na mikroporézny polyakrylamidový, polymér obsahujúci karboxylové funkčné skupiny (napr. BIO-Gel CM 100, výrobok fy BIO-RAD Laboratories Richmond USA) podľa nasledujúceho postupu: 100 mg nosiča sa aktivuje 100 mg karbodiimidu rozpusteného v 25 ml vody okyselenej kyselinou chlorovodíkovou na pH 4,8. Aktivácia prebieha za miešania 30 minút pri laboratórnej teplote. Aktivovaný nosič sa postupne premýva 250 ml Tris-HCl tlmivého roztoku pH 7,2. Aktivovaný gél sa oddelí filtráciou cez fritu a suspenduje v 15 ml 0,1 mol.l^{-1} Tris-HCl tlmivého roztoku pH 7,2. Ku suspenzii sa pridá 1,24 mg preparátu D-galakturonandigalakturonohydrolázy rozpustenej v 2 ml príslušného tlmivého roztoku. Po 16 hodinách miešania pri teplote 4 °C sa gél oddelí vhodným postupom.

P r í k l a d 2

Na 100 mg nosiča aktivovaného vo vode rozpustným karbodiimidom podľa príkladu 1, suspendovaného v 10 ml tlmivého roztoku pH 7,0 sa aplikuje 1,6 mg preparátu D-galakturonandigalakturonohydrolázy rozpustnej v 7 ml tlmivého roztoku pH 7,0. Po 6 hodinách trepania pri laboratórnej teplote sa gél dodelí odstreďovaním, dekantáciou, alebo filtráciou cez fritu.

P r í k l a d 3

Aktivovaný nosič suspendovaný vo vode alebo v 0,1 mol.l^{-1} Tris-HCl tlmivom roztoku pH 7,2 sa naplní do kolóny cez ktorú sa filtruje roztok obsahujúci D-galakturonandigalakturonohydrolázu v horeuvedenom tlmivom roztoku dovtedy, kým efluent neprestane vykazovať enzýmovú aktivitu. Kolóna sa potom premyje 0,1 mol.l^{-1} Tris-HCl tlmivým roztokom pH 7,0.

Imobilizovaná D-galakturonandigalakturonohydroláza má využitie všade tam, kde ide o úplnú degradáciu pektínových látok napr. v konzervárenskom a vinárskom priemysle. Jej

najefektívnejšie využitie spočíva v príprave kyseliny digalakturónovej (kľúčový substrát k identifikácii exo-D-galakturonanáz), doteraz na svetovom trhu nedostupnej.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy imobilizovanej D-galakturonandigalakturonohydrolázy, vyznačený tým, že sa eným zakotví pri pH 6,6 až 7,4, teplote 4 až 25 °C na polymérnu látku akrylamidového typu s výhodou na polyakrylamidový nosič s karboxylovými funkčnými skupinami.