



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

203818

(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 08 B 15/02

/22/ Prihlášené 22 06 79
/21/ /PV 4301-79/

(40) Zverejnené 30 06 80

(45) Vydané 15 11 82

(75)
Autor vynálezu

GEMEINER PETER ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy merkaptodeoxycelulózy

1

Vynález sa týka spôsobu prípravy merkaptodeoxycelulózy z chlorodeoxycelulózy.

Vodonerozpustné nosiče obsahujúce tiolové skupiny majú široké možnosti uplatnenia v rôznych oblastiach enzýmového inžinierstva. Najčastejšie sa používajú v afinitnej chromatografii tiolových enzýmov /Methods in Enzymology 34 [Affinity Techniques] 1974/ a pri imobilizácii enzýmov /O. R. Zaborsky, Immobilized Enzymes, CRC Cleveland 1974/. Až na polyakrylamidového prechodcu /Enzacryl Polythiol, Koch-Light/ sa dnes vyrábajú polytioly výlučne na báze polysacharidov, a to hlavne agarózy napr.: Activated Thiol-Sepharose 4B, Thiopropyl-Sepharose 6B, či sieťovanej agarózy napr.: príslušné polytioly série Sepharose CL, všetko Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala.

Príprava týchto polysacharidov obsahujúcich tiolové skupiny vychádza z aktivácie polysacharidu brómkyanom [Activated Thiol-Sepharose 4B, Upplands Grafiska AB /1974/ resp. z O-alkylácie agarózy bis-epoxidmi či α -halohydrínmi /R. Axén, H. Drevin, J. Carlsson, Acta Chem. Scand. B 29 /1975/ 471; H. Nishikawa, P. Bailon, J. Solid-Phase Biochem. 1 /1976/ 33/. Uvedené postupy jednak používajú u nás netradičné polysacharidy /agaróza, dextrans/ ako aj devízové chemikálie /napr.: brómkyan, glutathión, 2,2'-dipyridyldisulfid, bisepoxidy, dithiothreitol/. Navyše u celulózy nedávajú tieto spôsoby prípravy uspokojivé výsledky /J. Zemek, Ľ. Kuniak, P. Gemeiner, PV - 7358/78/. Na druhej strane sa javí ako vhodný východiskový materiál pre prípravu tiol-polysacharidov chlórdeoxycelulóza /CD-celulóza/, ľahko pripraviteľná za miernych reakčných podmienok s pomerne vysokými stupňami substitúcie /DS 0,3/ /T. L. Vigo, C. W. Welch, Textile J. Res. 40 /1970/ 109/. Chlór v tejto CD-celulóze možno nahradiť bežnými nukleofilnými substituentami, napr. -amino, -merkpto, -hydroxy a iné. Tak je v prípade chlórdeoxydextransu popísaná substitúcia za tiosíran za vzniku tiosíran-deoxydextransu /TSD-dextransu/ /A. F. Kolova et al., Cell. Chem. Technol. 12 /1978/ 553/. Takýto TSD-dextrans sa potom prevedie alkalickým štiepením v prostredí argónu na merkaptodeoxydextrans /MD-dextrans/.

Naše výsledky výskumu v tejto oblasti ukázali, že aj CD-celulózu je možno uspokojivo previesť na tiosíran-deoxycelulózu. Jej redukcia tiolmi, ako sú napr.: kyselina tioglykolová alebo 2-merkaptoetanol v slabo alkalickom prostredí a v prítomnosti chelátotvorných činidiel, vedie ku tvorbe merkaptodeoxy-celulózy.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že v prvom stupni sa prevedie CD-celulóza vo vodnom roztoku tiosíranu sodného pri teplote 90 až 105 °C po dobu 35 až 45 hodín pri mólovom pomere CD skupiny polysacharidu : tiosíran 1:10 až 15 pri hydromodule 10 až 15 na tiosíran-deoxy-celulózu, načo v druhom stupni po premytí produktu do negatívnej reakcie na tiosírany a vysuší sa prídá vodný tlmivý roztok kyseliny tioglykolovej resp. 2-merkaptoetanolu o pH 7,7 až 7,9 obsahujúci 1 až 5 mM Chelaton 3 pri mólovom pomere tiosíranové skupiny polysacharidu : tiol 1:15 až 20 a pri hydromodule 10 až 15 a nechá pôsobiť 20 až 40 minút pri teplote 20 až 30 °C.

CD-celulóza pripravená podľa T. L. Vigo, C. M. Welch, Textile Res. J. 40 /1970/ 109 s DS 0,3 až 0,6 je dostatočne vhodná pre prípravu MD-celulózy. Takáto CD-celulóza má výrazne zvýšenú tepelnú odolnosť.

Zavedenie tiosíranovej skupiny sa môže prevádzať s tiosíranom sodným pri teplote 90 až 105 °C po dobu 35 až 45 hodín. Výsledný produkt obsahuje 0,4 až 0,6 mmólov tiosíranových skupín na 1 g suchého preparátu.

Redukcia tiosíranovej skupiny na tiolovú sa prevádza pôsobením kyseliny tioglykolovej či 2-merkaptoetanolu vo vodných tlmivých roztokoch pH 7,7 až 7,9 obsahujúcich Chelaton 3. Po redukcii sa produkt rýchlo premyje pufrovaným vodným roztokom obsahujúcim Chelaton 3[†], destilovanou vodou obsahujúcou Chelaton 3 a acetón. Výsledný produkt obsahuje 0,25 až 0,5 mmólov tiolových skupín na 1 g suchého preparátu.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy merkaptodeoxy-celulózy je, že preparáty umožňuje vyrábať z domácich lacných surovín pomerne jednoduchým technologickým postupom.

Príklady prevedenia

P r í k l a d 1

10 g chlorodeoxy-celulózy /CD-celulózy/ obsahujúcej 1,8 mmóla Cl/g sa nechá napučať v 100 ml 2,1 M vodného roztoku tiosíranu sodného. Reakčná zmes sa potom udržiava 40 hodín pri 100 °C za občasného premiešania. Produkt sa premyje vodou do negatívnej reakcie na tiosíranové ióny, acetónom a nechá sa vysušiť pri 40 °C. Suchý produkt sa rozsuspenderuje v 80 ml 0,1 M vodného roztoku hydrouhličitanu sodného obsahujúceho 5 mM Chelaton 3. Za stáleho miešania sa prídá 10 ml kyseliny tioglykolovej a pH sa upraví prídáním koncentrovaného hydroxidu sodného na 7,8. Suspenzia sa nechá miešať 30 minút pri laboratórnej teplote. Produkt sa rýchlo premyje na sklenom filtri 0,1 M vodným roztokom hydrouhličitanu sodného obsahujúcim 5 mM Chelaton 3, destilovanou vodou obsahujúcou 1 mM Chelaton 3 a acetónom, vždy do negatívnej reakcie na tioly. Produkt sa vysuší pri 40 °C.

Preparát obsahuje 2,4 % síry a 0,475 mmólov/g titrovateľných tiolových skupín.

Poznámka: [†]Chelaton 3 - sodná soľ kyseliny etyléndiaminotetraoctovej

P r í k l a d 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že pri redukcii tiosíranu CD-celulózy sa použije 10 ml 2-merkaptoetanolu. Suchý produkt obsahuje 2,85 % síry a 0,33 mmólov/g titrovateľných tiolových skupín.

P r í k l a d 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako východisková CD-celulóza sa použije preparát s obsahom 3,2 mmólov Cl/g a v 1. stupni 3,85 M vodný roztok tiosíranu sodného. Suchý produkt obsahuje 2,5 % síry a 0,25 mmólov/g titrovateľných skupín.

Vynález má uplatnenie všade, kde je potrebné izolovať či čistiť enzýmy a iné bielkoviny obsahujúce tiolové skupiny a kde je výhodné imobilizovať enzýmy prostredníctvom ich cysteínových zvyškov, a to či už v priemyselnej praxi alebo vo výskume.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy merkaptodeoxy-celulózy vyznačený tým, že chlorodeoxycelulóza sa v prvom stupni nechá reagovať s vodným roztokom tiosíranu sodného pri teplote 90 až 105 °C po dobu 35 až 45 hodín pri mólovom pomere chlorodeoxy CD skupiny polysacharidu : tiosíran 1:10 až 15 pri hydromodule 10 až 15, načo v druhom stupni, po premytí produktu do negatívnej reakcie na tiosírany a vysušení sa pridá vodný tlmivý roztok kyseliny tioglykovej alebo 2-merkaptoetanolu o pH 7,7 až 7,9 obsahujúci 1 až 5 mM Chelaton 3 pri mólovom pomere tiosíranové skupiny polysacharidu : tiol 1:15 až 20 a pri hydromodule 8 až 12 a nechá pôsobiť 20 až 40 minút pri teplote 20 až 30 °C a nakoniec sa premýva rýchlo na filtri vodným tlmivým roztokom obsahujúcim 1 až 5 mM Chelaton 3, destilovanou vodou obsahujúcou 0,5 až 1 mM Chelaton 3 a acetónom, vždy do negatívnej reakcie na tioly.