



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

Patent tymczasowy dodatkowy
do patentu nr -----

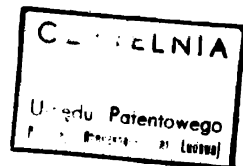
Int. Cl.³ C12N 11/02

Zgłoszono: 08.05.81 (P. 231035)

Pierwszeństwo -----

Zgłoszenie ogłoszono: 15.03.82

Opis patentowy opublikowano: 15.06.1984



Twórcy wynalazku: Józef Synowiecki, Marian Naczek, Zdzisław Sikorski

Uprawniony z patentu tymczasowego: Politechnika Gdańska,
Gdańsk (Polska)

Sposób osadzania enzymów na nośniku chitynowym

Przedmiotem wynalazku jest sposób osadzania enzymów na nośniku chitynowym.

Znany z literatury: A. Kilara „The use of immobilized enzymes in the Food Industry, a review“ Critical Reviews in Food Science and Nutrition, vol. 12, Tissue 2, 1979; W.L. Stanley, G.G. Watters, J.M. Mercer „Lactose and other Enzymes bound to Chitin with Glutaraldehyde“, Biotechnology and Bioengineering, vol XII, 315–326, 1975, sposób osadzania enzymów na nośniku chitynowym polega na działaniu na chitynę wodnym roztworem enzymu, w obecności aldehydu glutarowego, spełniającego rolę środka sieciującego. Występujące w cząsteczkach aldehydu glutarowego dwie grupy karbonylowe pośredniczą w procesie wiązania enzymu z nośnikiem, łącząc się za pomocą jednej grupy z chityną a za pomocą drugiej z białkiem enzymu.

Znany jest również z polskiego opisu patentowego nr 115426 sposób osadzania hydrolaz glikozydów na nośniku chitynowym, który polega na chemisorpcji enzymów na chitynie otrzymanej z odpadów po przerobieniu kryla. Osadzenie enzymu prowadzi się w roztworze wodnym.

Niedogodnością pierwszego opisanego wyżej sposobu jest zmniejszenie aktywności enzymu spowodowane częściową jego denaturacją pod działaniem aldehydu glutarowego.

Niedogodnością sposobu według polskiego opisu patentowego jest to, iż około 50% osadzonego enzymu, związanego za pomocą oddziaływań elektrostatycznych, uwalnia się przy wzroście siły jonowej środowiska reakcji.

Sposób osadzania enzymów na nośniku chitynowym otrzymanym z odpadów po przerobieniu kryla z udziałem aldehydu alifatycznego, według wynalazku charakteryzuje się tym, że rozdrobioną chitynę korzystnie o średnicy ziaren 0,3–0,75 mm aktywuje się aldehydem o jednej grupie karbonylowej korzystnie od 1 do 3 węgli w cząsteczce, przy pH=8,5, w czasie 1 godziny i w temperaturze 20°C, po czym na tak uaktywnioną chitynę działa się wodnym roztworem enzymu co najmniej przez 2 godziny i w temperaturze 20°C.

Korzystne jest stosowanie 1,5 M wodnego roztworu aldehydu mrówkowego zachowując wagową proporcję nośnika i roztworu enzymu 1 : 200 oraz wodnego roztworu enzymu zachowując wagową proporcję chityny i enzymu 1 : 200.

Chitynę korzystnie o średnicy ziaren 0,3–0,75 mm otrzymuje się z odpadów pancerza kryla, poddając je demineralizacji 10–25% kwasem solnym, przez 2 godziny, w temperaturze 20°C, w

stosunku wagowym 1 : 20 po czym prowadzi się odbiałczenie 5–25% wodorotlenkiem potasu, przez 2 godziny, w temperaturze 90°C, w stosunku wagowym 1 : 20, przemywa wodą do pH = 7, a następnie metanolem.

Jako enzymy stosuje się diastozę, α i β — amylazę lub glukoamylazę.

Nieoczekiwanym efektem był wzrost aktywności enzymów unieruchomionych na chitynie aktywowanej aldehydem o jednej grupie funkcyjnej w porównaniu z preparatami enzymów unieruchomionych metodą chemisorpcji lub sieciowania aldehydem glutarowym (tab. 1).

T a b e l a 1

Metoda unieruchomienia β — amylazy	Szybkość reakcji enzymatycznej (mg/min)	Aktywność względna V/V ₀ (%)
chemisorpcja	1,27	100
unieruchomienie w obecności aldehydu glutarowego	0,88	69,4
unieruchomienie na chitynie aktywowanej HCHO	1,75	137,2

Zastosowanie do wstępnej aktywacji chityny aldehydu glutarowego zamiast aldehydu o jednej grupie funkcyjnej nie powoduje poprawy, lecz spadek aktywności unieruchomionych enzymów (tab. 2).

T a b e l a 2

Metoda unieruchomienia β — amylazy (preparat diastezy)	Aktywność względna V/V ₀ (%)
chemisorpcja	100
sieciowanie w obecności aldehydu glutarowego	56,9
unieruchomienie na chitynie aktywowanej aldehydem glutarowym	53,8

Przy pH środowiska reakcji wyższym od 6,0 siła wiązania białka enzymatycznego na chitynie krylowej wstępnie aktywowanej monoaldehydem jest większa niż w przypadku metody chemisorpcji. Przy zwiększeniu siły jonowej do $\mu = 0,7$ za pomocą 5% roztworu KCl nie stwierdzono spadku aktywności enzymów unieruchomionych na aktywowanej chitynie (tab. 3).

T a b e l a 3

Metoda unieruchamiania β — amylazy	Aktywność jako szybkość reakcji enzymatycznej (mg/min)	
	bez przemywania KCl $\mu = 0$	po działaniu KCl $\mu = 0,7$
chemisorpcja	1,27	0,60
sieciowanie w obecności aldehydu glutarowego	0,88	0,79
unieruchomienie na chitynie aktywowanej HCHO	1,75	1,66

Przy stosowaniu zamiast aldehydu mrówkowego jego wyższych homologów, działanie aktywujące zmniejsza się (tab. 4).

T a b e l a 4

Metoda unieruchomienia β — amylazy	Aktywność względna V/V_0 po działaniu 5% KCl (%)
chemisorpcja	100
unieruchamianie na chitynie aktywowanej HCHO	275
unieruchamianie na chitynie aktywowanej CH_3CHO	177

Przyczyną przyrostu aktywności i trwałości wiązania enzymów unieruchomionych na chitynie wstępnie aktywowanej monoaldehydami jest wzrost ilości ośrodków wiązania białka enzymu z chityną.

Zaletą wynalazku jest uzyskanie preparatów unieruchomionego enzymu bez spowodowanej denaturacją utraty aktywności, zwiększenie stężenia enzymu na powierzchni nośnika poprzez wzrost ilości ośrodków wiązania enzymu z chityną, oraz ograniczenie desorpcji przez zastąpienie słabych oddziaływań elektrostatycznych trwalszymi wiązaniami. Umożliwia to prowadzenie procesów enzymatycznych z większą wydajnością przy równoczesnym zaoszczędzeniu bardzo drogich enzymów.

Przedmiot wynalazku ilustruje przykład wykonania.

Przykład. Chitynę krylową o rozdrobnieniu ziaren 0,3–0,75 mm aktywuje się przez 1 godzinę 5% wodnym roztworem formaldehydu o $\text{pH} = 8,5$ (chityna: 5% roztwór formaldehydu 1 : 200) w temperaturze 20°C , okresowo mieszając. Następnie chitynę oddziela się i przemywa wodą (chityna: H_2O , 1 : $2 \cdot 10^4$). Do tak aktywowanej chityny dodaje się roztwór β — amylazy lub glukoamylazy o stężeniu 1 mg/cm^3 , albo α — amylazy o stężeniu $30 \mu\text{g/cm}^3$, zachowując wagową proporcję nośnika i roztworu enzymu 1 : 200. Mieszaninę reakcyjną pozostawia się na 2 godziny w temperaturze 20°C , okresowo mieszając. Następnie unieruchomiony enzym oddziela się od mieszaniny reakcyjnej, przemywa wodą (chityna: H_2O , 1 : $2 \cdot 10^4$) i stosuje bezpośrednio do katalizowania reakcji enzymatycznej lub suszy znanymi sposobami.

Z a s t r z e ż e n i a p a t e n t o w e

1. Sposób osadzania enzymów na nośniku chitynowym otrzymanym z odpadów po przerobie kryla z udziałem aldehydu alifatycznego, **znamienny tym**, że rozdrobnioną chitynę aktywuje się aldehydem o jednej grupie funkcyjnej o $\text{pH} = 8,5$, przez 1 godzinę i w temperaturze 20°C po czym na tak uaktywnioną chitynę działa się wodnym roztworem enzymu przez 2 godziny i w temperaturze 20°C .

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się 1,5 M wodny roztwór aldehydu mrówkowego zachowując wagową proporcję chityny i aldehydu 1 : 200.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że wodny roztwór enzymu stosuje się zachowując wagową proporcję chityny i enzymu 1 : 200.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się chitynę o średnicy ziaren 0,3–0,75 mm.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako enzym stosuje się diastazę, α i β — amylazę lub glukoamylazę.