



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

216634

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 13 K 13/00

(22) Přihlášeno 07 04 81
(21) (PV 2600-81)

(40) Zveřejněno 31 12 81

(45) Vydáno 15 02 85

(75)

Autor vynálezu

BÁRTA MIROSLAV dr., KUČERA JIŘÍ ing. CSc.,
VOJTÍŠEK VLADIMÍR dr. CSc., ČULÍK KAREL dr., PRAHA

(54) Způsob imobilizace amyloglukozidázy

Amyloglukozidáza se imobilizuje sítě-
ním dialdehydem, zejména glutardialdehy-
dem, ve vodném prostředí v přítomnosti
flokulačního činidla, s výhodou polyaminu
a buněk mikroorganismů nebo jejich frag-
mentů. Bunky mikroorganismů mohou mít
před sítěním chemickou, biochemickou či
fyzikální cestou zvýšen počet skupin rea-
gujících s aldehydy a mohou nést další
enzymovou aktivitu.

Vynález se týká způsobu imobilizace amyloglukozidázy. Dosud je známa řada postupů přípravy vázané amyloglukozidázy, zahrnujících sorpci na různé nosiče, jako např. DEAE-celulózu, Amberlit IRA 93, kysličník hlinitý, nebo kovalentní vazbu na různé materiály, jako na porézní sklo potažené vrstvou kysličníků zirkónu, titanu, hliníku nebo hafnia, polyakrolein, na polysacharidové materiály pomocí solí titanu, cínu, zirkónu a železa, na chitin pomocí glutaraldehydu, nebo inkluzí do polyakrylamidového gelu, do vláken derivátů celulózy apod. Je znám i způsob imobilizace vazbou amyloglukozidázy na povrchy mikroorganismů jako jsou *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* a *Escherichia coli*, který se provádí pomocí titanu nebo předchozí aktivací mikroorganismů bifunkčními činidly. Rovněž je znám způsob kovalentního zesílení nerozpustného komplexu amyloglukozidázy s taninem pomocí glutardialdehydu.

Dosud známé způsoby imobilizace vyžadují buď speciální, často aktivované nosiče, které jsou velmi nákladné, nebo vedou k produktům s nízkou stabilitou nebo aktivitou, či k výraznému snížení maximální konverze substrátu v důsledku difúze.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob imobilizace amyloglukozidázy podle vynálezu založený na jejím sítění dialdehydem, zejména glutardialdehydem, jehož podstata spočívá v tom, že sítění amyloglukozidázy se provádí ve vodném prostředí v přítomnosti flokulačního činidla a buněk mikroorganismů a/nebo jejich fragmentů. Výhodné je použití flokulatoru z řady polyaminů, např. polyetyléniminu. Buněk mikroorganismů mohou být enzymově neaktivní, ale mohou s výhodou obsahovat i další enzymovou aktivitu, např. glukózooxidázovou a katalázovou nebo glukózoizomerázovou. Rovněž výhodné je, mají-li buňky mikroorganismů fyzikální, chemickou či biochemickou cestou zvýšený počet skupin reagujících s aldehydy a provádějí-li se sítění amyloglukozidázy za míchání při koncentraci enzymové bílkoviny 40 až 120 miligramů/ml, iontové síle roztoku 1 až 15 mS, teplotě 10 až 40 °C, pH 4,5 až 8, přičemž hmotnostní poměr mezi amyloglukozidázou a každou z ostatních složek reakční směsi je 1:0,05 až 0,5.

Způsob imobilizace podle vynálezu je technicky nenáročný a ekonomicky velmi výhodný. Celý proces obvykle nepřevyšuje dobu trvání 2 hodiny a výtěžek aktivity se pohybuje mezi 15 až 30 %. Předností takto připraveného vázaného enzymu je jeho zvýšená stabilita, získaná pomocí buněk mikroorganismů, která dovoluje jeho dlouhodobé přechovávání v suchém stavu bez výrazné ztráty aktivity. Přitom díky vysokému specifickému povrchu buněk je jejich množství nutné ke stabilizaci poměrně malé, což umožňuje zachování vysoké aktivity vázaného enzymu. Tato aktivita je vyšší než u většiny preparátů získaných dosud známými způsoby imobilizace amyloglukozidázy. Výhodné rovněž je, že lze použít buněk mikroorganismů odpadajících při průmyslových fermentacích, např. mycelia *Penicillium chrysogenum*, které je odpadem při fermentaci penicilinu, takže jejich pořizovací náklady jsou prakticky nulové.

Amyloglukozidáza použitá pro imobilizaci postupem podle vynálezu může být např. komerční technický preparát, který je buď předčištěn a odsolen nebo pouze odsolen.

Buňky mikroorganismů mohou být nativní, ale mohou být též předem fyzikálně, chemicky nebo biochemicky ošetřeny tak, aby na jejich povrchu stoupl počet skupin reagujících s aldehydy. Tyto skupiny jsou představovány především volnými aminoskupinami bílkovin a aminoskupinami polysacharidových struktur buněčných stěn, tj. peptidoglykanu u prokaryotních mikroorganismů a chitinu, resp. chitosanu u organismů eukaryotních. Zvýšení počtu aminoskupin lze dosáhnout např. deacetylací N-acetylglukózaminových jednotek uvedených polymerů při alkalické hydrolýze.

Mohou však být použity i buňky mikroorganismů, které obsahují ještě další enzymovou aktivitu, katalyzující přeměnu glukózy vznikající katalytickým účinkem amyloglukozidázy. Jedná se především o buňky obsahující glukózooxidázovou a katalázovou aktivitu, jako jsou *Aspergillus niger*, nebo buňky s glukózoizomerázovou aktivitou, jako např. *Streptomyces olivochromogenes*.

Přidá-li se flokulátor do roztoku amyloglukozidázy, dojde ke vzniku nerozpustného komplexu enzym-flokulátor, který se oddělí od roztoku ve formě sraženiny. Jestliže jsou před přidáním flokulátoru v roztoku enzymu suspendovány buňky mikroorganismů, uzavřou se v komplexu enzym-flokulátor. Přidáním polyfunkčních činidel, zvláště dialdehydů a zejména glutardialdehydu, dojde ke vzájemnému zesílení všech složek. Takto získaný komplex je nerozpustný ve vodě a organických rozpouštědlech a obsahuje vysoké množství amyloglukozidázové aktivity. Základní tvar vznikajících částic komplexu je zhruba sférický až plošný, s průměrnou velikostí 0,5 až 3 mm. Velikost částic, jejich tvar a pevnost lze do jisté míry ovlivnit podmínkami způsobu přípravy, tj. koncentrací a kvalitou jednotlivých složek, iontovou silou, pH, teplotou, intenzitou míchání a reakční dobou. Zpevnění a snížení bobtnavosti částic lze dosáhnout např. vysušením z vody nebo z prostředí organického rozpouštědla s vodou mísitelného, jako např. aceton. Částice lze po přípravě rovněž dále tvarovat, např. krájením nebo stříháním.

P ř í k l a d 1

1 000 ml amyloglukozidázy NOVO AMC 150 L se frakčně sráží síranem amonným. Frakce 30 až 71 % nasycení se rozpustí ve 2 950 ml vody a poté se roztok přefiltruje a odsolí ultrafiltrací na zařízení Amicon 2 000 s membránou PM 10. Po odsolení se získá 960 ml roztoku o vodivosti 6,6 mS, aktivitě 148 EU/ml a koncentraci bílkovin 75 mg/ml. Výtěžek aktivity je 87,7 %. 100 ml tohoto roztoku enzymu se upraví 1 N NaOH tak, aby jeho pH bylo 5,0 a poté se v něm suspenduje 2,5 g mycelia *Penicillium chrysogenum*. Toto mycelium se předem chemicky ošetří tak, že se jeho 10 % suspenze v 5 N NaOH zahřívá na vodní lázni po dobu 3 hodin. Nato se mycelium promyje vodou do neutrální reakce a odfiltruje. Po suspendování mycelia v roztoku amyloglukozidázy se za stálého míchání vnese 18 ml 10% vodného roztoku polyetyleniminu SEDIPUR CL - 903 a poté 8 ml 25% vodného roztoku glutardialdehydu. Po 30minutovém míchání následuje 30 minut stání, po kterém se vzniklý materiál odfiltruje, promyje 200 ml deionizované vody, načež se suspenduje ve 100 ml ledového acetonu. Po 5 minutách míchání se aceton odsaje a hotový nerozpustný preparát se vysuší prosáváním vzduchem. Jeho hmotnost je 6,8 g, aktivita amyloglukozidázy 420 EU/g a poločas inaktivace 1 920 hod.

P ř í k l a d 2

Ve 100 ml roztoku o vodivosti 6,6 mS, aktivitě amyloglukozidázy 148 EU/ml a koncentraci bílkovin 75 mg/ml, jehož pH se upraví 1 N NaOH na hodnotu 5 se suspenduje 10 g nativního mycelia *Aspergillus niger* s glukózooxidázovou a katalázovou aktivitou. Dále se postupuje stejně jak uvádí příklad 1. Získá se 11,5 g částic nerozpustného komplexu o aktivitě amyloglukozidázy 300 EU/g a glukózooxidázy 74 EU/g.

P ř í k l a d 3

Ve 100 ml roztoku o vodivosti 6,6 mS, aktivitě amyloglukozidázy 148 EU/ml o koncentraci bílkovin 75 mg/ml, jehož pH se upraví 1 N NaOH na hodnotu 5, se suspenduje 15 g nativního mycelia *Streptomyces olivochromogenus* s glukózoizomerázovou aktivitou. Dále se postupuje stejně jako v příkladu 1. Získá se 16,8 g částic nerozpustného komplexu o aktivitě amyloglukozidázy 280 EU/g a aktivitě glukózoizomerázy 64 EU/g.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob imobilizace amyloglukozidázy sítěním dialdehydem, zejména glutardialdehydem, vyznačující se tím, že sítění amyloglukozidázy se provádí ve vodném prostředí v přítomnosti flokulačního činidla a buněk mikroorganismů a/nebo jejich fragmentů.

2. Způsob imobilizace podle bodu 1, vyznačující se tím, že flokulačním činidlem je polyamin, např. polyetylénimin.

3. Způsob imobilizace podle bodu 1 a 2, vyznačující se tím, že buňky mikroorganismů jsou enzymově neaktivní nebo nesou další enzymovou aktivitu, např. glukózooxidázovou, katalázovou nebo glukózoizomerázovou.

4. Způsob imobilizace podle bodů 1 až 3, vyznačující se tím, že buňky mikroorganismů mají fyzikální, chemickou či biochemickou cestou zvýšen počet skupin reagujících s aldehydy.

5. Způsob imobilizace podle bodů 1 až 4, vyznačující se tím, že sítění amyloglukozidázy se provádí za míchání při koncentraci enzymové bílkoviny 40 až 120 mg/ml, iontové síle roztoku 1 až 15 mS, teplotě 10 až 40 °C, pH 4,5 až 8, přičemž hmotnostní poměr mezi amyloglukozidázou a každou z ostatních složek reakční směsi je 1:0,05 až 0,5.