



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

206 992

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 25 10 79
(21) PV 7255-79

(51) Int. Cl.³C 12 N 9/04

(40) Zveřejněno 15 09 80

(45) Vydáno 01 11 83

(75)
Autor vynálezu KUČERA JIŘÍ ING.CSc., HRADIL JIŘÍ ING.CSc., ŠTAMBERG JIŘÍ ING.CSc.,
RADA VÁCLAV ING., PRAHA a TOMÍŠEK JOSEF, KOLÍN

(54) Způsob separace glukózooxidázy

1

Vynález se týká způsobu separace glukózooxidázy z roztoků získaných extrakcí plisňových buněk.

K separaci glukózooxidázy z roztoků se dosud užívá způsob, při kterém se glukózooxidáza sorbuje na mikrokryсталické fibrilární celulóze s dietylaminoetylovými nebo dietylaminohydroxypropylovými výměnnými skupinami, ionexová celulóza se zachycenou glukózooxidázou se odfiltruje a čistá glukózooxidáza se izoluje elucí.

Nevýhody tohoto způsobu tkví především v tom, že vláknitá struktura mikrokryсталické celulózy je příčinou špatné filtrovatelnosti a sorpci nelze provádět kontinuálně v kolonách, ale pouze násadou celulózy do zpracovávaného roztoku. Další nevýhodou tohoto způsobu je jeho nepřesnost a špatná reprodukovatelnost.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob separace glukózooxidázy podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se roztok glukózooxidázy uvádí do styku s celulózou v perlové formě s dietylaminoetylovými nebo dietylaminohydroxypropylovými výměnnými skupinami o velikosti zrn 30 až 800 μm a zachycená glukózooxidáza se izoluje ze sorbentu elucí.

Výhodou způsobu podle vynálezu je, že jej lze provádět jak šaržovitě násadou celulózy do roztoku glukózooxidázy, tak i kontinuálně průtokem roztoku kolonou naplněnou perlovou celulózou. Je to umožněno vlastností perlové celulózy a jejich derivátů, které jsou v potřebném rozsahu tlaků nestlačitelné a nezpůsobují pokles průtoku v závislosti na tlaku. Další výhodou tohoto způsobu je jeho přesnost a reprodukovatelnost. Makroporézní charakter perlové celulózy umožňuje, na rozdíl od fibrilární celulózy, uplatnit při sorpci nejen vnější, ale i vnitřní povrch a perlová celulóza obsahuje vyšší množství sorpčně aktivních skupin, takže dochází ke zvýšení sorpční kapacity vůči glukózooxidáze.

208 992

Příklad 1 :

v 1 000 ml roztoku glukózooxidázy o aktivitě $4.500/\mu\text{l O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bylo suspendováno 2,5 g DEAE-perlové celulózy obsahující 2,0 milimolů diethylaminoetylových skupin v 1 g při velikosti zrna 30 μm . Suspenze byla míchána 30 minut při 20 °C a potom byl sorbent odfiltrován. Ve filtrátu bylo zjištěno 7,75 % původní aktivity. Veškerá sorbovaná enzymová aktivita byla ze sorbentu eluována 1 M roztokem chloridu sodného při teplotě 15 až 20 °C.

Příklad 2 :

v 1 000 ml roztoku glukózooxidázy o aktivitě $4.500/\mu\text{l O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ bylo suspendováno 10 g DEAMP-celulózy obsahující 2,5 milimolu diethylaminohydroxypropylových skupin v 1 g při velikosti zrna 30 μm . Suspenze byla míchána 30 minut při 20 °C a potom byl sorbent odfiltrován. Ve filtrátu bylo zjištěno 15 % původní enzymové aktivity. Veškerá sorbovaná enzymová aktivita byla ze sorbentu eluována 1 M roztokem chloridu sodného při teplotě 15 až 20 °C.

Příklad 3 :

DEAE - celulóza perlová o koncentraci diethylaminoetylových skupin 2,0 milimolů / g byla naplněna do sloupce rozměrů 0,9 x 15 cm. Sloupcem byl propouštěn roztok glukózooxidázy o aktivitě $4.500/\mu\text{l O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ rychlostí 1 $\text{ml cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$. Při zjištěné aktivitě 340 $\text{ml O}_2 \text{ ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ve vytékajícím roztoku z kolony, tj. po průtoku 500 ml roztoku kolonou, bylo propouštění zastaveno. Potom byl sloupec promyt vodou a enzym byl eluován 1 M roztokem chloridu sodného. V eluátu bylo získáno 92,25 % veškeré vložené enzymové aktivity.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob separace glukózooxidázy z roztoků získaných extrakcí plíseňových buněk sorpcí na celulóze s diethylaminoetylovými nebo diethylaminohydroxypropylovými výměnnými skupinami, vyznačený tím, že se roztok uvádí do styku s celulózou v perlové formě o velikosti zrn 30 až 800 μm , načež se zachycená glukózooxidáza izoluje ze sorbentu elucí.
2. Způsob separace podle bodu 1, vyznačený tím, že se roztok glukózooxidázy nechá protékat vrstvou celulózy v perlové formě.