



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(61) Дополнительное к авт. свид-ву -

(22) Заявлено 29.05.78 (21) 2620877/23-04

с присоединением заявки № -

(23) Приоритет -

Опубликовано 15.07.82, Бюллетень № 26

Дата опубликования описания 15.07.82

(11) 943280

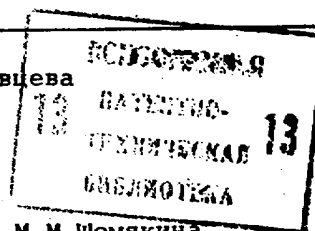
(51) М. Кл.³

С 12 N 11/00
А 61 К 37/48

(53) УДК 577.15.
.07(088.8)

(72) Авторы
изобретения

Л.В.Козлов, Ю.И.Крылова, Л.В.Кудрявцева
и В.И.Суровцев



(71) Заявитель

Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина

(54) СПОСОБ КОНСЕРВАЦИИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

1

Изобретение относится к способам консервации иммобилизованных ферментов, позволяющим избежать существенной потери активности при длительном хранении и транспортировке промышленно изготовленных препаратов иммобилизованных ферментов. Способ консервации может найти широкое применение при изготовлении препаратов иммобилизованных ферментов для использования их в пищевой, химической и микробиологической промышленности.

Известно, что для длительного хранения белков и ферментов используют лиофильное высушивание, которое в большинстве случаев обеспечивает стопроцентное сохранение активности и нативности препаратов. В случае потерь активности при лиофилизации в раствор фермента перед высушиванием добавляют различные инертные наполнители, растворимые в воде [1].

Лиофильное высушивание иммобилизованных ферментов также широко применяется для получения форм препаратов, выдерживающих длительное хранение, однако часто сопровождается частичной потерей активности.

2

Наиболее близким к предлагаемому является способ консервации иммобилизованных ферментов путем лиофильного высушивания суспензии иммобилизованного фермента, в частности пепсина, в воде или буфере, который имеет тот недостаток, что в зависимости от использованного для иммобилизации носителя, при высушивании теряется от 10 до 90% активности [2].

15 Цель изобретения - уменьшение потерь активности фермента при высушивании.

20 Цель достигается тем, что согласно способу консервации иммобилизованных ферментов путем лиофильного высушивания их суспензии в воде или буфере, у суспензии добавляют инертный растворимый наполнитель при соотношении фермент:наполнитель 1:(1-20).

25 В качестве инертного наполнителя используют неорганические соли, например поваренную соль.

30 В качестве инертного наполнителя используют аминокислоты, например глицин.

В качестве инертного наполнителя используют углеводы, например глюкозу, сахарозу.

В качестве инертного наполнителя используют водорастворимые полисахариды, например декстран.

В качестве инертного наполнителя используют полиспирты, например полиэтиленгликоль.

В качестве инертного наполнителя используют водорастворимые синтетические полимеры, например поливинилпирролидон.

Перед высушиванием к суспензии иммобилизованного фермента в воде или буфере добавляют инертный растворимый в воде наполнитель, который предохраняет препарат иммобилизованного фермента от потери активности при лиофильном высушивании и легко может быть удален перед использованием препарата иммобилизованного фермента путем отмывания водой.

Препараты иммобилизованных ферментов сохраняют активность, превышающую в несколько раз (в ряде случаев в 8 раз) активность препаратов, подвергнутых лиофильному высушиванию без наполнителя.

Перед последующим использованием фермента наполнитель может быть легко удален отмыванием буфером или центрифугированием.

Пример 1. 20 мг пепсина свиный, иммобилизованного на аэросиле, суспендируют в 1 мл воды, содержащей инертный растворимый наполнитель в весовом соотношении к препарату иммобилизованного фермента от 1:1 до 20:1. Смесь лиофильно высушивают. Перед использованием препарат суспендируют в 0,01 М ацетатном буфере, pH 4,5 и удаляют наполнитель путем отмывания буфером на колонке или с помощью центрифугирования. Активность препаратов, определенная по гемоглобину в качестве субстрата, приведена ниже в виде процентного отношения активности лиофильно высушенных препаратов к активности исходного препарата до лиофилизации:

Без наполнителя	9
С глицином в соотношении 10:1	16
20:1	25
С глюкозой в соотношении 1:1	50
10:1	53
С сахарозой в соотношении 1:1	44
20:1	63
С поливинилпирролидоном (МВ 25000) 1:1	67
10:1	75
С декстраном (МВ 500000) 1:1	25

С полиэтиленгликолем (МВ 3000) 1:1	78
С NaCl в соотношении 1:1	21
10:1	31
20:1	35

Пример 2. 20 мг куриного пепсина, иммобилизованного на диатомите, консервируют аналогично иммобилизованному пепсину свиный.

Активность по гемоглобину лиофильно высушенных препаратов, %:	
Без наполнителя	50
С глицином в соотношении 1:1	60
10:1	67

Пример 3. 20 мг протосубтилина, иммобилизованного на сфероне AgA 1000, суспендируют в 1 мл 0,01 М фосфатного буфера, pH 8,0 и консервируют аналогично консервации иммобилизованного пепсина. Активность лиофильно высушенных препаратов по гемоглобину, %:

Без наполнителя	80
С глюкозой в соотношении 1:1	93
С полиэтиленгликолем (МВ 3000) 1:1	86

Пример 4. 20 мг протосубтилина, иммобилизованного на энзакриле AA, консервируют аналогично консервации протосубтилина, иммобилизованного на сфероне. Активность лиофильно высушенных препаратов по гемоглобину, %:

Без наполнителя	74
С глюкозой в соотношении 1:1	100
С полиэтиленгликолем (МВ 3000) 1:1	93

Формула изобретения

1. Способ консервации иммобилизованных ферментов путем лиофильного высушивания их суспензии в воде или буфере, отличающийся тем, что, с целью уменьшения потери активности фермента при высушивании, к суспензии добавляют инертный растворимый наполнитель при соотношении фермент:наполнитель 1:(1-20).

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве инертного наполнителя используют неорганические соли, например поваренную соль.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве инертного наполнителя используют аминокислоты, например глицин.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве инертного наполнителя используют углеводы, например глюкозу, сахарозу.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве инертного наполнителя используют полимеры, например поливинилпирролидон.

тного наполнителя используют водорастворимые полисахариды, например декстран.

6. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве инертного наполнителя используют полиспирты, например полиэтиленгликоль.

7. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве инертного наполнителя используют водорастворимые синтетические полимеры, например поливинилпирролидон.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе

1. Патент США № 3133001, кл. 195-68, опублик. 12.05.64.

2. Крылова Ю.И., Козлов Л.В., Антонов В.К. Гаина Б.С., Датуншвили Е.Н., Павленко Н.М. Имобилизация кислых протеиназ. - "Биоорганическая химия", 1976, вып.2, с.273 (прототип).

Составитель О.Скородумова
 Редактор Н.Киштулинец Техред Ж. Кастелевич Корректор И.Муска
 Заказ 5037/34 Тираж 505 Подписное
 ВНИИПИ Государственного комитета СССР
 по делам изобретений и открытий
 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5
 Филиал ППП "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4