



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

202 373

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlásené 13 11 78

(21) PV 7360-78

(51) Int. Cl.³ C 12 N 11/14

(40) Zverejnené 30 04 80

(45) Vydané 01 04 83

(75)

Autor vynálezu KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA a ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICA

(54) Spôsob prípravy imobilizovaných enzýmov

1

Prihláška vynálezu sa týka prípravy imobilizovaných enzýmov viazaných na perlovej celulóze obsahujúcej karbonylové skupiny.

Princípy imobilizácie enzýmov na rôznych polymérnych nosičoch sú dnes dostatočne známe nielen z literárnych údajov [Methods in Enzymology, Vol. XLIV, Immobilized Enzymes, Ed. Klaus Morbach, Academic Press, New York, San Francisco, London 1976], ale i mnohých praktických aplikácií tak vo výskume, ako i v priemyselnej praxi.

Chemická imobilizácia enzýmov na vhodnom nosiči patrí k najrozšírenejším spôsobom imobilizácie, pričom ako nosič sa používajú rôzne syntetické polyméry, ale i prírodné polysacharidy: škrob, celulóza, dextrany a i. Ak sa použije ako nosič vlákňitá alebo prášková celulóza, je potrebné pred imobilizáciou enzýmu vytvoriť na celulóze vhodnú funkčnú skupinu, ktorá je schopná v druhom stupni kovalentne intereagovať s príslušnými skupinami enzýmu. Takouto skupinou je napr. karbonylová skupina, ktorá sa veľmi jednoducho vytvorí známou oxidáciou celulózy, resp. iného polysacharidu s jodistanom draselným. (T. P. Novell: Methods in Carbohydrate Chemistry New York 1963, str. 165-68).

Je však známe, že polymérny nosič, na ktorom je enzým viazaný má zásadný význam na aplikačné možnosti imobilizovaných enzýmov v priemyselnej praxi. Polymérny nosič musí mať dostatočne veľký napúšťací objem v reakčnom médiu, aby bola zabezpečená dostatočná rýchlosť difúzie substrátu k aktívnym centráam imobilizovaného enzýmu.

Z uvedených dôvodov sú pre imobilizáciu natívne polysacharidy ako celulóza a škrob nevhodné. Treba ich preto vhodným spôsobom chemicky modifikovať, aby napúšťací objem polysacharidového gélu bol dokonale prístupný i pre väčšie molekuly substrátu. Veľmi vhodným celulóзовým nosičom pre imobilizáciu enzýmov ukázala sa byť perlová celulóza (čs. AO č. 172640 (1976)), ktorá spĺňa náročné požiadavky polymérneho nosiča pre kovalentné viazanie enzýmov.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že v prvom stupni sa perlová celulóza oxiduje vo vodnom roztoku s jodistanom draselným, alebo sodným pri izbovej teplote po dobu 10 až 24 hodín za použitia 0,03 až 0,25 mólu jodistanu draselného na anhydroglukózovú jednotku celulózy, načo sa v druhom stupni po premytí produktu destilovanou vodou do negatívnej reakcie na jodistan pridá vodný roztok enzýmu v množstve 10 až 50 % na váhu suchého celulóзовého oxidovaného nosiča a nechá sa za miešania reagovať po dobu 10 až 24 hodín pri pH 4 až 8 podľa pH optima a stability viazaného enzýmu pri teplote 4 až 40 °C.

Pri oxidácii perlovej celulózy je dôležité, aby sa reakčná zmes nemiešala vysokoobrátkovým miešadlom, pretože by mohlo dôjsť k drobeniu celulóзовých guľčiek, čo má za následok zvyšovanie odporu pri práci na kolone. Je účelné preto voliť veľmi nízke obrátky potrebné len na to, aby celulóзовá suspenzia počas reakcie nesedimentovala.

Reakčná doba potrebná na dosiahnutie potrebného oxidačného stupňa nepresahuje 10 až 24 hodín pri izbovej teplote. Pri nízkych stupňoch oxidácie sa v uvedenom reakčnom čase oxidačné reagens spotrebuje takmer na 98 %, t.j. nie je potrebné po ukončení reakcie nezreagovaný jodistan chemicky eliminovať. Stačí na filtri premyť destilovanou vodou a hneď pokračovať s naviazaním aplikovaného enzýmu. Enzým sa pridáva vo vodnom roztoku pri optimálnom pH aplikovaného enzýmu. Naviazanie enzýmu je ukončené do 24 hodín pri teplote 4 až 40 °C podľa tepelnej stability enzýmu.

Výhodou predmetnej imobilizácie enzýmov na perlovej celulóze je predovšetkým to, že perlová celulóza v dôsledku presnej guľovej geometrie častíc má veľmi dobré vlastnosti pri práci v kolone, ako i dostatočne vysoký napúšťací objem vo vodnom roztoku, čím sú podmienené dobré difúzne rýchlosti substrátu k aktívnym centráam imobilizovaného enzýmu.

Príklady prevedenia

Príklad 1

K 16 g mokrej perlovej celulózy (sušina 10,5 %) sa pridá roztok 40 ml vody s 0,115 g jodistanu draselného. Reakčná suspenzia sa pri laboratórnej teplote nechá reagovať pri stálom miešaní 24 hodín. Miešanie nesmie byť intenzívne, len také, aby perlová celulóza nesedimentovala. Po ukončení oxidácie sa perlová celulóza odfiltruje a premyje destilovanou vodou, pričom sa získa produkt so stupňom oxidácie 0,05, t.j. každá 20. anhydroglukózová jednotka je oxidovaná na dialdehyd v polohe C₂, C₃.

K premytej dialdehyd celulóze sa pridá 60 ml 0,05 M barátového pufru o pH 8,6. K uvedenej suspenzii sa pridá roztok pseudocholínesterázy (acylcholín acylhydroláza EC 3.1.1.8) v množstve 0,5 g o aktivite 120 U/mg v 50 ml 0,05 M barátového pufru o pH 8,6 za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke. Reakcia imobilizácie prebieha po dobu 24 hodín

pri teplote 4 °C. Po ukončení reakcie sa perlová celulóza s imobilizovaným enzýmom odfiltruje, na filteri sa premyje 10 %-ným roztokom NaCl, aby sa vymyl podiel enzýmu viazaného fyzikálne. Premytý imobilizovaný enzým mal aktivitu 1800 U/g mokrej celulózy a zachoval si túto aktivitu pri skladovaní pri teplote 10 °C po dobu 1 roka.

Príklad 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že na imobilizáciu použijeme enzým α -amylázu (α -1,4-glukán glukánohydroláza EC 3.2.1.1) (*Bacillus subtilus*) vo fosfátovom pufrí o pH = 7.

Príklad 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že na imobilizáciu použijeme enzým glukamyláza (α -1,4-glukán glukánohydroláza EC 3.2.1.3) (*Endomycopsis bispora*) vo fosfátovom pufrí o pH = 6.

Vynález sa môže uplatniť všade, kde sa používajú imobilizované enzýmy vo výskume, alebo priemyselovej aplikácii, resp. humánnej medicíne.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy imobilizovaných enzýmov vyznačujúci sa tým, že v prvom stupni sa perlová celulóza oxiduje vo vodnom roztoku s jodistanom draselným alebo sodným pri izbovej teplote po dobu 10 až 24 hodín za použitia 0,03 až 0,25 mólov jodistanu draselného na anhydroglukózovú jednotku celulózy, načo v druhom stupni po premytí produktu destilovanou vodou do negatívnej reakcie na jodistan sa pridá vodný roztok enzýmu v množstve 10 až 50 % na váhu suchého oxidovaného celulóзовého nosiča a nechá sa za miešania reagovať po dobu 10 až 24 hodín pri pH = 4 až 8 podľa pH optima a stability viazaného enzýmu pri teplote 4 až 40 °C.