



GRAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

247097
(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 11/08

(22) Přihlášeno 06 04 82
(21) (PV 1312-85)

(40) Zveřejněno 13 02 86

(45) Vydáno 15 08 88

(72)

Autor vynálezu

BOROS LÁSZLÓ dr., DARÓCZI IVÁN, HUBER IRÉN, IVONY JÓZSEFNÉ,
BUDAPEŠŤ, KISS JÁNOSNÉ, SZEGED, SZAJÁNI BÉLA dr., BUDAPEŠŤ
(MLR)

(73)

Majitel patentu

„REANAL“ FINOMVEGYSZERGYÁR, BUDAPEŠŤ (MLR)

(54) Způsob imobilizování enzymu aminoacylasy

1

2

Způsob imobilizování enzymu aminoacylasy aktivací parciálně zhydrolyzovaného kopolymeru, připraveného popřípadě alkalickou hydrolýzou kopolymeru akrylamidu s N,N'-methylen-bis(akrylamidem) a nanesením aminoacylasy, při kterém se parciálně zhydrolyzovaný kopolymer akrylamidu s N,N'-methylen-bis(akrylamidem), připravený alkalickou nebo kyselou hydrolýzou, uvede do reakce s karbodiimidem rozpustným ve vodě nebo rozpustným v organickém rozpouštědle při teplotě pod 0 °C, získaný aktivovaný nosič se smíchá s roztokem aminoacylasy o hodnotě pH 6,5 až 8,5 a vzniklý produkt se promyje a popřípadě se vysuší.

Imobilizovaná aminoacylasy se používá k štěpení DL-aminokyselin.

Vynález se týká způsobu imobilizace enzymu aminoacylasa.

Pro imobilizování aminoacylasy izolované z enzymů obsažených ve vepřových ledvinách, nebo aminoacylasy mikrobiálního původu, bylo až dosud popsáno mnoho způsobů. Podle způsobů popsaných v časopisech J. Am. Chem. Soc. 81, 4024 (1959) a Coll. Czech. Chem. Commun. 36, 2398 (1971) se aminoacylasa naváže na DEAE celulózu iontovými vazbami. Aminoacylasu lze však rovněž imobilizovat kovalentními vazbami.

Podle jedné ze známých metod se jako nosiče používá kopolymeru akrylamidu s methakrylátem zesíťovaného N,N-methylen-bis(akrylamidem); nosič se zpracuje hydrazinem, vzniklý produkt se aktivuje dusitanem sodným v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové a na vzniklý azid karboxylové kyseliny se pak naváže enzym (viz časopis Macromolecules 4, 350, 1971).

Podle jiného známého způsobu se nosič typu Enzacrylu AA (polyakrylamidový derivát obsahující aromatické aminoskupiny) aktivuje dusitanem sodným v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové a vzniklý diazoderivát se kopuluje s enzymem (viz časopis Coll. Czech. Chem. Commun. 38, 943, 1973).

Všechny známé způsoby pro imobilizování enzymu mají společnou nevýhodu v tom, že poskytují preparáty s imobilizovaným enzymem s nízkou specifickou aktivitou.

Z francouzské vytištěné přihlášky vynálezu číslo 2 198 954 je známo imobilizovat enzymy včetně enzymu aminoacylasy mícháním a spojováním enzymu, nebílkovinového pojidla, sesítujícího prostředku a vody a/nebo organických rozpouštědel v jakémkoliv sledu a promytím získaného produktu vodou. Jakožto pojidel se může použít polyethyleniminů nebo polyaminů a jako sesítujících prostředků karbodiimidů; jakožto výhodný sled se uvádí nejdříve smíšení enzymu ve vodě a/nebo v organickém rozpouštědle s pojidlem a teprve tato směs se pak mísí se sesítujícím činidlem.

Z amerického patentového spisu číslo 3 794 563 je známé použití polymerů akrylamidu sesíťovaného například N-methylen-bis-akrylamidem pro imobilizování enzymů. Ve sloupci 1, řádek 69 a ve sloupci 2, řádek 2 tohoto spisu se uvádí, že kovalentní vazba enzymu na polymer má ten nedostatek, že se musí reaktivní podmínky potřebné pro kovalentní vázání pečlivě kontrolovat, aby se předešlo destrukci molekuly enzymu a že je zpravidla obtížné odstranit vyčerpaný enzym z polymeru, jestliže má být do polymeru včleněn čerstvý enzym.

Z amerického patentového spisu číslo 3 933 589 je znám způsob imobilizování enzymu na nosiči, přičemž se enzym, nosič a chemické imobilizační činidlo udržují ve vzájemném styku při teplotě a po dobu dostatečnou k chemické imobilizaci enzymu, přičemž se jako chemického imobilizačního prostředku používá předem připraveného

reakčního roztoku alkandiaminu a alkandihalogenidu.

Z britského patentového spisu č. 1 289 549 je znám způsob přípravy ve vodě nerozpustného enzymového přípravku, při kterém se nechává reagovat enzym rozpuštěný nebo suspendovaný ve vodném roztoku s uhlíčeným celulózy nebo s derivátem diazotovaného diaminobenzenu uhlíčenému celulózy, přičemž se jako nedostatek tohoto způsobu imobilizace na str. 1, řádek 50 až 53 britského patentového spisu č. 1 257 263 uvádí nízký výtěžek fixovaných bílkovin, nezajištěné vázání bílkovin a jejich denaturace při vázání.

V britském patentovém spise č. 1 257 263 se popisuje způsob přípravy produktů obsahujících aktivní bílkovinné látky, při kterém se uvádí substrát, při jehož definování se neuvádí aminoacylasa, do styku s roztokem alespoň jedné aktivní bílkovinné látky v přítomnosti můstkového členu, přičemž alespoň jedna bílkovinná látka je schopna reagovat s můstkovým členem, za vytváření kovalentně vázaných můstků mezi molekulami aktivní bílkovinné látky nebo aktivních bílkovinných látek za vytvoření nebo bez vytvoření takových můstků mezi substrátem a aktivní bílkovinnou látkou nebo aktivními bílkovinnými látkami, načež se substrát spolu s alespoň jednou aktivní bílkovinnou látkou izoluje.

Jakkoliv se podle britského patentového spisu č. 1 257 263 připomíná použití karbodiimidů jako můstkových látek, můstková látka se vždy nechává reagovat s enzymem bez předchozího vázání na substrát, jak je zřejmé například ze strany 7, řádek 10 až 21 (v bodu 1 definice předmětu vynálezu) britského patentového spisu č. 1 257 263.

V časopise Journal of Applied Biochemistry 1980, 2 (1), str. 72 až 80 se popisuje imobilizování aminoacylasy nosičovým prostředím typu aktivovaného polyakrylamidu, přičemž nosič obsahuje karboxylové funkční skupiny. Není však uvedena ani zmínka o zpracování nosiče parciální hydrolýzou amidových skupin polyakrylamidu ani o aktivaci nosiče karbodiimidy. Z tohoto hlediska se uvádí, že polyakrylamidové deriváty obsahující karboxylové skupiny se mohou rovněž připravit kopolymerací akrylamid-/N,N'-methylen-bis-(akrylamid)u a akrylové kyseliny. Je tedy známo několik způsobů aktivace odlišných od aktivace karbodiimidy, například ve formě azidů kyseliny přes hydrazidy kyseliny.

Úkolem vynálezu je za vyloučení nedostatků známého stavu techniky vyvinout způsob imobilizování aminoacylasového enzymu za vzniku imobilizovaného enzymového prostředku majícího mnohem vyšší specifickou účinnost než známé přípravky.

Nyní se s překvapením zjistilo, že preparát s imobilizovaným enzymem o specifické aktivitě vyšší nejméně o dva řády, než je

aktivita známých prostředků, lze získat tím způsobem, že se aminoacylasa imobilizuje na nosiči připraveném částečnou hydrolyzou Akrylexu typu P, kopolymeru akrylamidu a N,N'-methylenbis(akrylamidem).

Akrylex typu P, kuličkový kopolymer akrylamidu s N,N'-methylen-bis(akrylamidem) (Akrilex P-30, P-100 a P-200) je výrobkem maďarské společnosti Reanal Finomvegyszergyár. Hydrolyzuje-li se tento kopolymer kyselinou (jako kyselinou chlorovodíkovou nebo jinou silnou kyselinou) nebo alkálií (jako hydroxidem sodným, uhlíkatem sodným nebo jinou silnou bází), převede se asi 50 % amidických skupin ($-\text{CONH}_2$) na karboxylové skupiny, zatímco zbývající amidické skupiny se nehydrolyzují ani za ostrých reakčních podmínek.

V důsledku toho jsou ve zhydrolyzovaném kopolymeru umístěny mezi vzniklými karboxylovými skupinami nezhydrolyzované amidické skupiny, které fixují karboxylové skupiny ve vhodných prostorových polohách. Když se o sobě známou karbodiimidovou aktivací metodou naváže aminoacylasa na karboxylové skupiny, funkce jednotlivých imobilizovaných molekul enzymu navzájem neinterferují vzhledem k příznivým sterickým polohám karboxylových skupin; proto takto připravený preparát obsahující imobilizovaný enzym vykazuje velmi vysokou specifickou aktivitu.

Vynález se tedy týká způsobu imobilizace enzymu aktivováním parciálně zhydrolyzovaného kopolymeru, připraveného podrobováním akrylamid/N,N'-methylen-bis-(akrylamid)ového kopolymeru, popřípadě alkalicke hydrolyze a následným nanesením aminoacylasy, který je charakterizován tím, že se částečně zhydrolyzovaný akrylamid/N,N'-methylen-bis(akrylamid)ový kopolymer, připravený kyselou nebo alkalickou hydrolyzou, uvede do reakce o sobě známým způsobem s karbodiimidem rozpustným ve vodě nebo rozpustným v organickém rozpouštědle při teplotě pod 0 °C, získaný aktivovaný nosič se smíchá s roztokem aminoacylasy o hodnotě pH 6,5 až 8,5 a vzniklý produkt se promyje a pak se popřípadě vysuší.

Při způsobu podle vynálezu se tedy používá parciálně zhydrolyzovaného akrylamid/N,N'-methylen-bis(akrylamid)ového kopolymeru typu Akrylex P, jakožto nosiče, zatímco podle francouzské vytištěné přihlášky vynálezu č. 2 198 954 se takového nosiče nemůže použít, nýbrž se může používat toliko polyethyleniminů nebo polyaminů; hlavním rozdílem mezi způsobem podle vynálezu a způsobem podle vytištěné francouzské přihlášky vynálezu č. 2 198 954 je však skutečnost, že podle vynálezu se karboxylové skupiny akrylamid(akrylová kyselina)N,N'-methylen-bis-(akrylamid)ového kopolymeru, vytvořené parciální hydrolyzou akrylamid/N,N'-methylen-bis-(akrylamid)ového kopolymeru, jakožto nosiče aktivují karbodiimidovou sloučeninou a takto

připravený derivát typu O-acylisomočoviny se nechává reagovat s primárními aminoskupinami enzymu, zatímco při způsobu podle vytištěné francouzské přihlášky vynálezu č. 2 198 954 míšením polymerů obsahujících iminoskupiny nebo aminoskupiny, karbodiimidové sloučeniny a enzymu za odpovídajících podmínek karboxylové skupiny aspargylových a/nebo glutamylových postranních řetězců enzymu poskytují s karbodiimidovou sloučeninou derivát typu O-acylisomočoviny, který reaguje s iminoskupinami nebo s aminoskupinami nosiče, přičemž nevýhodou tohoto způsobu je nemožnost vyloučení tvoření vazeb mezi molekulami aktivovaného enzymu nebo mezi molekulami enzymu, což zhoršuje stupeň účinnosti imobilizační reakce, zatímco reakce při způsobu podle vynálezu je přísně kontrolována.

Způsob podle vynálezu se značně liší také od způsobu podle amerického patentového spisu č. 3 794 563, jelikož se podle amerického patentového spisu neprovádí žádné sesíťování karbodiimidových sloučenin a kromě toho se jako enzym neuvádí aminoacylasa.

Způsob podle vynálezu se také značně liší od způsobu podle amerického patentového spisu č. 3 933 589, jelikož nosiče používané podle vynálezu jsou zcela odlišné od nosičů používaných podle amerického patentového spisu č. 3 933 589, což také platí pro karbodiimidovou sloučeninu používanou při způsobu podle vynálezu na rozdíl od reakčního roztoku alkandihalogenidu a alkandiaminu, používaného při způsobu podle amerického patentového spisu, který se nijak netýká karbodiimidové sloučeniny jako způsob podle vynálezu.

Mezi způsobem podle vynálezu a mezi způsobem imobilizace podle britského patentového spisu č. 1 289 549 je zásadní rozdíl v tom, že se podle britského patentového spisu používá uhlíkatanu celulózy nebo jeho diazotovaného diaminobenzenového derivátu zatímco podle vynálezu parciálně zhydrolyzovaného akrylamid/N,N'-methylen-bis-(akrylamid)ového kopolymeru.

Přičemž nevýhody produktů podle britského patentového spisu č. 1 289 549 byly již připomenuty, zvláště nízký výtěžek fixovaných bílkovin, nezajištění vázání bílkovin a jejich odbourávání při vázání, zatímco k těmto nedostatkům při způsobu podle vynálezu nedochází. Při způsobu imobilizování podle vynálezu se dosahuje vyšších výtěžků (76 %) imobilizovaného enzymu aminoacylasy a vzniklá kovalentní vazba je pevná (může se štěpit pouze varem v silně alkalickém nebo v silně kyselém prostředí).

Na rozdíl od způsobu podle britského patentového spisu č. 1 257 263, při kterém se můstkové činidlo nechává vždy reagovat s enzymem bez jeho předchozího vázání na substrát, při způsobu podle vynálezu se karbodiimidová sloučenina nejdříve váže na

akrylamid/*N,N'*-methylen-bis-(akrylamid)-ový kopolymer a jedině takto získaný materiál se zpracovává roztokem aminoacylasy.

Z britského patentového spisu č. 1 257 263 tedy není známa ani největší část skutečností o způsobu imobilizace podle vynálezu uváděných v předvýznamové části definice předmětu vynálezu ani skutečnosti uváděné ve významové části. Způsob podle vynálezu ve srovnání se způsobem podle britského patentového spisu č. 1 257 263 zahrnuje také rozdíly již uvedené při srovnávání s jinými způsoby imobilizování.

Parciálně zhydrolyzovaný akrylamid/*N,N'*-methylen-bis-(akrylamid)ový kopolymer, používaný při způsobu imobilizování podle vynálezu, má mnohem výhodnější vlastnosti než jiné nosiče, jako nosiče získané kopolymerací akrylamid/*N,N'*-methylen-bis-(akrylamid)u a akrylové kyseliny. Kromě toho je aktivita aminoacylasy, imobilizované způsobem podle vynálezu, o dva řády vyšší než aminoacylasy aktivované například ve formě azidu kyseliny přes hydrazid kyseliny.

Jakkoliv podle dosud známých způsobů aktivace se dosáhlo horších výsledků, je způsob imobilizování aminoacylasy podle vynálezu vázáním aminoacylasy na O-acylisomočovinnový meziprodukt, vytvořený aktivací karboxylových skupin nosiče připraveného parciální hydrolýzou polyakrylamid-akrylamid/*N,N'*-methylen-bis-(akrylamid)-ového kopolymeru karbodiimidovou sloučeninou založený na vynálezecké aktivitě i se zřetelem na poznatky podle J. Appl. Biochem., 1980, 2(1), str. 72 až 80.

Jako enzymu se při způsobu podle vynálezu může používat aminoacylasy jakéhokoli původu a izolované jakoukoliv metodou, avšak s výhodou se jako výchozí látky používá enzymu izolovaného z ledvin savců novým způsobem podle evropské patentové přihlášky č. 81 900 726.1 (číslo publikace 59 182).

Jako karbodiimidové sloučeniny lze k aktivování částečně zhydrolyzovaného kopolymeru typu Akrixu P používat například metho-p-toluensulfonátu 1-cyklohexyl-3-(2-morfolinoethyl)karbodiimidu nebo 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)karbodiimidu. S výhodou se k tomuto účelu používá ve vodě rozpustných karbodiimidů. Z karbodiimidů rozpustných pouze v organických rozpouštědlech lze při způsobu podle vynálezu používat pouze takových sloučenin, které jsou dostatečně rozpustné v daných organických rozpouštědlech i při nízkých teplotách, tedy při teplotách pod 0 °C.

Aminoacylasy se aplikuje na aktivovaný nosič z roztoku o hodnotě pH 6,5 až 8,5, s výhodou z téměř neutrálního roztoku (hodnota pH přibližně 7,0). Výhodně se používá roztoku aminoacylasy v 0,1 molárním pufru fosforečnanu draselného o hodnotě pH 7,0.

Preparát s imobilizovaným enzymem, získaný při shora uvedeně kopulační reakci, se o sobě známým způsobem promyje a po-

případě se vysuší. Enzymový preparát lze rovněž skladovat, účelně ve formě vodné suspenze v přítomnosti vhodného stabilizačního činidla, jako je například azid sodný.

Specifická aktivita preparátů s imobilizovanou aminoacylasou, připravených způsobem podle vynálezu, je 150 až 200 jednotek na 1 mg suchého gelu, což ve srovnání se specifickou aktivitou 0,55 až 2,24 jednotky na miligram suchého gelu u preparátů připravitelných způsobem popsaným v časopise *Macromolecules* 4, 350 (1971) znamená zvýšení velikosti aktivity při nejmenším o dva řády.

Při zkouškách nových preparátů s imobilizovaným enzymem bylo neočekávaně zjištěno, že po imobilizování enzymu došlo ke zvýšení jeho stability v alkalické oblasti hodnot pH. Tato vlastnost je velmi výhodná v případě, že se preparátu s imobilizovaným enzymem používá k enzymatickému štěpení DL-aminokyselin. Je známo, že enzymatické štěpení DL-aminokyselin probíhá nejrychleji při hodnotě pH přibližně 7,5 a reakční rychlost klesá s klesající hodnotou pH.

Vzhledem k tomu, že se hodnota pH reakční směsi během postupujícího štěpení stále posunuje do kyselé oblasti, reakční rychlost s časem kontinuálně klesá. Když se ke štěpení DL-aminokyselin použije nových enzymatických preparátů podle vynálezu, které vykazují zvýšenou stabilitu v alkalické oblasti hodnot pH, může se štěpení zahájit při vyšších hodnotách pH než obvykle a tím se kompenzuje snížení reakční rychlosti způsobené kontinuálním poklesem hodnoty pH.

Způsob podle vynálezu podrobně objasňuje následující příklad provedení, který však rozsah vynálezu žádným způsobem neomezuje.

Příklad

Suspenze 30 g suchého gelu Akrixu P-100 v jednom litru 1N vodného roztoku hydroxidu sodného se zahřívá po dobu 3 hodin na 50 °C. Nabobtnalý gel se promývá do neutrální reakce 12 litry destilované vody a pak se pokračuje v promývání 10,5 litru 0,05 N vodné kyseliny chlorovodíkové. Nakonec se gel promyje ještě 30 litry destilované vody a pak se lyofilizuje. Získá se 26 g nosného materiálu o vázací kapacitě 6,14 miliekvivalentu/g.

Možnost a)

K suspenzi 10 g suchého gelu, připraveného shora popsaným způsobem, v 500 ml pufru fosforečnanu draselného o hodnotě pH 7,0 se za stálého míchání a za chlazení ledovou vodou přidá roztok 20 g metho-p-toluensulfonátu 1-cyklohexyl-3-(2-morfolinoethyl)karbodiimidu ve 250 ml chladného (+4 °C) roztoku stejného pufru. Po 10 mi-

nutách míchání se přidá roztok 5 g aminoacylasy, připravené z přečištěných vepřových ledvin, ve 250 ml chladného ($+4^{\circ}\text{C}$) roztoku pufru a suspenze se míchá po dobu 48 hodin při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$.

Gel se oddělí a promyje postupně třemi dávkami po 1 litru 0,1 molárního pufru fosforečnanu draselného o hodnotě pH 7,0, třemi dávkami po 1 litru 0,1 molárního pufru fosforečnanu draselného obsahujícího rovněž 0,5 molu chloridu sodného (hodnota pH = 7,0) a třemi dávkami po 1 litru 0,1 molárního pufru fosforečnanu draselného. Pak se gel promývá až je prostý solí čtyřmi dávkami po 2,5 litru destilované vody a lyofilizuje se. Získá se 18 g preparátu s imobilizovaným enzymem aminoacylasou.

Aktivita:

hydrolýza 158 μmol N-acetyl-L-methioninu/hodina/mg suché substance.

Použitá aminoacylasa se připraví tímto způsobem: 8 kg přečištěných vepřových ledvin se rozmělní a pak zhomogenizuje se 16 litry chladné ($+4^{\circ}\text{C}$) destilované vody. Zhomogenizovaná směs se míchá po dobu jedné hodiny v ledové lázni a pak se odstředí. Supernatant se zahřeje na teplotu 70°C , udržuje se na této teplotě po dobu 10 minut, pak se směs ochladí v lázni s ledovou vodou a odstředí se. K supernatantu se přidá 2 554 g síranu amonného, směs se nechá stát přes noc a vzniklá suspenze se odstředí.

Oddělená sraženina se rozpustí v malém množství chladné ($+4^{\circ}\text{C}$) destilované vody a roztok se dialyzuje proti destilované vodě až je prostý solí. Zdialyzovaný roztok se

zfiltruje a filtrát se lyofilizuje: získá se 7,2 gramu aminoacylasy.

Aktivita:

hydrolýza 2 735 μmol N-acetyl-L-methioninu/hod. mg bílkoviny.

Možnost b)

Suspenduje se 10 g suchého gelu, připraveného shora popsáním způsobem, v 500 ml 0,1 molárního pufru fosforečnanu draselného o hodnotě pH 7,0 a k suspenzi se za stálého míchání a za chlazení ledovou vodnou lázní přidá roztok 10 g 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)karbodiimidu ve 250 ml chladného ($+4^{\circ}\text{C}$) roztoku stejného pufru. Po 10 minutách míchání se přidá roztok 5 g aminoacylasy, připravené shora popsáním způsobem, ve 250 ml chladného ($+4^{\circ}\text{C}$) roztoku pufru a suspenze se míchá po dobu 48 hodin při teplotě $+4^{\circ}\text{C}$. Gel se oddělí a promyje se postupně třemi dávkami po 1 litru 0,1 molárního pufru fosforečnanu draselného, třemi dávkami po 1 litru 0,1 molárního fosforečnanu draselného obsahujícího rovněž 0,3 molu chloridu sodného a třemi dávkami po 1 litru 0,1 molárního pufru fosforečnanu draselného o hodnotě pH 7,0. Pak se gel promývá až do odstranění solí čtyřmi dávkami po 2,5 litru destilované vody a lyofilizuje se. Získá se 16 g preparátu obsahujícího imobilizovanou aminoacylasu.

Aktivita:

hydrolýza 202 μmol N-acetyl-L-methioninu/hodina/mg suché substance.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob imobilizování enzymu aminoacylasy aktivací parciálně zhydrolyzovaného kopolymeru, připraveného kyselou nebo alkalickou hydrolýzou kopolymeru akrylamidu s N,N'-methylen-bis(akrylamidem) a nanesením aminoacylasy, vyznačený tím, že se parciálně zhydrolyzovaný kopolymer akryl-

amidu s N,N'-methylen-bis(akrylamidem) uvede do reakce s karbodiimidem rozpustným ve vodě nebo rozpustným v organickém rozpouštědle při teplotě pod 0°C , získaný aktivovaný nosič se smíchá s roztokem aminoacylasy o hodnotě pH 6,5 až 8,5 a vzniklý produkt se promyje a popřípadě se vysuší.