



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

201 363
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³ C 12 N 11/12

(61)

(23) Výstavná priorita

(22) Prihlášené 13 11 78

(21) PV 7358-78

(40) Zverejnené 29 02 80

(45) Vydané 01 03 83

(75) Autor vynálezu ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICA, KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc. a GEMEINER PETER ing. CSc., BRATISLAVA

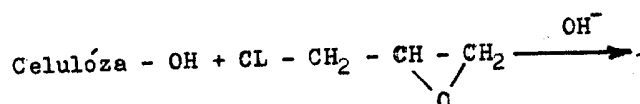
(54) Príprava imobilizovaných enzýmov

1

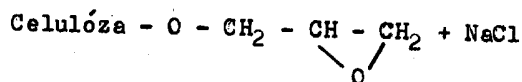
Vynález sa týka prípravy imobilizovaných enzýmov viazaných na perlovú celulózu obsahujúcu oxiranové skupiny.

Princípy imobilizácie enzýmov na rôznych nosičoch sú dnes dostatočne známe nielen z literárnych záznamov (R. Epton, T. H. Thomas: "An introduction to water insoluble enzymes", Koch-Light Laboratories Ltd. England 1971), ale i mnohých praktických aplikácií vo výskume i v priemyslovej praxi.

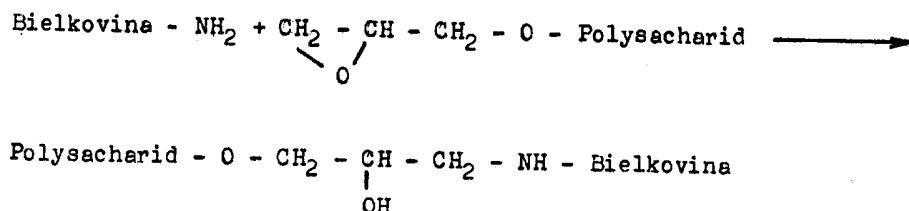
Chemická imobilizácia enzýmov na vhodnom nosiči patrí k najrozšírenejším spôsobom imobilizácie, pričom ako nosiče sa používajú rôzne syntetické polyméry ale i prírodné polysacharidy; škrob, celulóza, dextrany a i. Ak sa použije ako nosič vlákňitá alebo prášková celulóza, je nutné pred imobilizáciou enzýmu vytvoriť na celulóze vhodnú funkčnú skupinu, ktorá by bola schopná v druhom stupni kovalentne interreagovať s príslušnými skupinami príslušného enzýmu. Takouto skupinou je napr. oxiranová skupina, ktorá sa veľmi jednoducho získa pomocou epichlórhydrínu (R. Axén, H. Drevin a J. Carlson: Acta Chem. Scand. B 29 (1975) str. 471-474), keď sa reakčné podmienky volia tak, aby epichlórhydrín reagoval len substitučne cez chlór pri zachovaní oxiranového kruhu podľa schémy:



201 383



V druhom stupni aminoskupiny bielkoviny enzýmu reagujú s oxiránovou skupinou modifikovaného polysacharidu podľa reakčnej schémy:



čím sa získava imobilizovaný enzým kovalentne viazaný na polysacharidový nosič so všetkými výhodami známymi pre imobilizované enzýmy.

Je však známe, že polymérny nosič, na ktorom je enzým viazaný má zásadný význam na aplikačné možnosti imobilizovaných enzýmov v priemyselovej praxi. Polymérny nosič musí mať dostatočne veľký napúšťací objem v reakčnom médiu, aby bola zabezpečená dostatočná rýchlosť difúzie substrátu k aktívnym centráм imobilizovaného enzýmu a tiež difúzie produktov enzymatickej reakcie z gélu nosiča.

Z uvedených dôvodov sú pre imobilizáciu enzýmov 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.

Ideálnym celulóзовým nosičom pre imobilizáciu enzýmov ukázala sa byť perlová celulóza (čs. patent č. 172 640 (1976)), ktorá spĺňa náročné požiadavky polymérneho nosiča pre imobilizáciu enzýmov.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že v prvom stupni sa perlová celulóza v alkalickom prostredí alkyluje s epichlórhydrínom pri teplote 20 až 50 °C po dobu 2 až 18 hodín pri molárnom pomere polysacharid : epichlórhydrín 1 : 0,1 až 2 a koncentrácii hydroxidu sodného 2 až 4 %, načo v druhom stupni po premytí produktu do neutrálnej reakcie vodou sa pridá roztok enzýmu v množstve 1 až 50 % na váhu suchého celulóзовého nosiča a nechá sa za miešania reagovať po dobu 10 až 24 hodín vo vodnom pufovacom roztoku pri pH 4 až 8 podľa pH optima stability viazaného enzýmu, pri teplote 4 až 40 °C.

Perlová celulóza pripravená podľa čs. patentu č. 172 640 má napúšťací objem vo vode 6 až 10 ml/g, a teda je dostatočne prístupná pre difúziu molekúl substrátu pre enzymové reakcie. Môže byť pripravená v rôznej veľkosti častíc podľa špecifickej požiadavky od 0,05 do 1 mm. Zásadne sa skladuje v mokrom stave s prídavkom azidu sodného v množstve 0,01 %.

Zavedenie oxiránovej skupiny sa môže prevádzať s epichlórhydrínom pri izbovej teplote po dobu 10 až 24 hodín alebo pri zvýšenej teplote 40 až 60 °C. Výsledný produkt obsahuje 300 až 400 μmol oxiránových skupín na 1 gram suchého preparátu.

Viazanie enzýmu prevádza sa pri teplote 4 °C, resp. pri izbovej teplote podľa tepelnej stability aplikovaného enzýmu. Po imobilizácii sa preparát premyje dokonale 10 %-ným roztokom NaCl. Stabilita imobilizovaného enzýmu na perlovej oxiranovej celulóze bola zachovaná po dobu 1 roka.

Výhodou predmetnej imobilizácie enzýmov na perlovej celulóze je predovšetkým to, že perlová celulóza v dôsledku presnej guľovej geometrie častíc má dostatočne vysoký napúšťací objem vo vodných roztokoch, čím sú podmienené dobré difúzne rýchlosti substrátu k aktívnym centráom imobilizovaného enzýmu, čo je limitujúcim faktorom rýchlosti enzýmových reakcií katalyzovaných pomocou imobilizovaných enzýmov.

Príklad 1

K 30 gramom mokrej perlovej celulózy (sušina 10,5 %) sa pridá 24 ml 1 M NaOH, dobre sa rozmieša a nechá sa pri izbovej teplote za miešania penetrovať 30 minút, potom sa pridá 5 ml epichlórhydrínu dobre sa zamieša a nechá sa reagovať 2 hodiny pri 50 °C. Produkt sa premyje destilovanou vodou a obsahuje 310 μ mól oxiranových skupín/g suchej vzorky. K premytej vzorke sa pridá 120 ml 0,05 N borátového pufru o pH = 8,6. K uvedenej suspenzii sa potom pridá roztok pseudocholínesterázy (acylcholín acylhydroláza, EC 3.1.1.8) (lg o aktivity 120 u/mg) v 100 ml 0,05 N borátového pufru o pH = 8,6 za stáleho miešania na elektromagnetickej miešačke pri nízkych obrátkach, aby sa guľičky perlovej celulózy nerozbili. Reakcia imobilizácie prebieha po dobu 24 hodín pri 4 °C. Po ukončení reakcie sa celulóza s imobilizovaným enzýmom odfiltruje a na filteri premyje 10 %-ným roztokom NaCl, aby sa vymyl podiel enzýmu viazaného fyzikálne. Premytý imobilizovaný enzým mal aktivitu 2100 U/g mokrej celulózy a zachoval si túto aktivitu pri skladovaní za laboratórnej teploty po dobu 1 roka.

Príklad 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že tvorbu oxiranu s epichlórhydrínom prevádzame pri laboratórnej teplote po dobu 18 hodín. Ďalší postup ako v príklade 1.

Príklad 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že na imobilizáciu použijeme enzým α -amylázu (α -1,4-glukán glukánhydroláza, EC 3.2.1.1) (*Bacillus subtilis*) vo fosfátovom pufri o pH = 7,0.

Príklad 4

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že na imobilizáciu použijeme enzým glukamylázu (α -1,4-glukán glukánhydroláza EC 3.2.1.3) (*Endomycopsis bispore*) vo fosfátovom pufri o pH = 6,0.

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

201 363

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 v alkalickom prostredí alkyluje s epichlórhydrínom pri teplote 20 až 50 °C po dobu 2 až 18 hodín pri molárnom pomere polysacharid : epichlórhydrín = 1 : 0,1 až 2 a koncentrácii hydroxidu sodného 2 až 4 %, načo v druhom stupni po premytí produktu destilovanou vodou do neutrálnej reakcie sa pridá roztok enzýmu v množstve 10 až 50 % na váhu suchého celulózového gélu a nechá sa za miešania reagovať po dobu 10 až 24 hodín vo vodnom pufovanom roztoku pri pH = 4 až 8, podľa pH optima a stability viazaného enzýmu, pri teplote 4 až 40 °C.