



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

202890

(11)

(B1)

/22/ Přihlášeno 10 01 79
/21/ /PV 239-79/

(51) Int. Cl.³
C 12 N 11/00

(40) Zveřejněno 30 03 80

(45) Vydáno 15 09 82

(75)

Autor vynálezu

KUČERA JIŘÍ ing. CSc. a KMÍNKOVÁ MILENA ing., PRAHA

(54) Způsob přípravy aktivovaného karboxylového nosiče pro immobilizaci enzymů

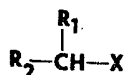
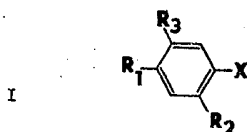
1

Vynález se týká přípravy aktivovaného karboxylového nosiče pro immobilizaci enzymů kovalentní vazbou.

Dosud se pro přípravu těchto aktivovaných karboxylových nosičů vychází z polysacharidových karboxylových polymerů, např. derivátů agarózy, jejichž karboxylové skupiny se převádějí přes estery a hydrazidy až na azidy, které jsou teprve aktivní pro kovalentní vazbu a enzymy. V některých případech lze použít reakce karboxylových skupin polymerů s karbodiimidy rozpustnými ve vodě. Je znám i způsob přípravy aktivovaného karboxylového nosiče spočívající na syntéze reaktivních esterů kyseliny akrylové a jejich následující polymeraci. Všechny tyto dosud známé způsoby jsou příliš pracné, zdlouhavé a v neposlední řadě nákladné.

Práce s karbodiimidy je navíc velmi nebezpečná a vyžaduje přísná bezpečnostní opatření pro jejich vysokou toxicitu. Cestou esterifikace monomeru kyseliny akrylové se získají polymery s aktivními esterovými skupinami orientovanými do nitra polymeru, což nezajišťuje požadovanou reaktivitu nosiče.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob přípravy aktivovaného karboxylového nosiče pro immobilizaci enzymů podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se na 100 g karboxylového polymerního katexu založeného na bázi polyakrylátu, polymetakrylátu, polykarboxystyrénu, případně na bázi derivátů polysacharidů, suspendovaného v aprotickém organickém rozpouštědle, působí při teplotě 20 až 120 °C 0,02 až 1,0 mol organického halogenidu vyjádřeného obecným vzorcem I nebo II



kde X je chlor, brom nebo jód a alespoň jeden ze substituentů R_1 , R_2 , R_3 je $-\text{NO}_2$, $-\text{COOC}_2\text{H}_5$, $-\text{CN}$, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$, $-\text{CO}-\text{CH}_3$, přičemž ostatní mohou být $-\text{H}$,

po dobu 2 až 24 hod. v přítomnosti ekvimolekulárního množství terciárního alkylaminu, alkoholaminu, případně pyridinu a 0,01 až 1,0 g bromidu alkalického kovu.

Způsob podle vynálezu umožňuje jednostupňovou přípravu aktivovaného karboxylového nosiče, což vede ke zrychlení a zjednodušení výrobního postupu a zároveň eliminuje nutnost pracovat s vysoce toxickými látkami. Využitím polymerních katexů dochází k podstatnému snížení nákladů na aktivaci. Vyrobené aktivované nosiče jsou v suchém stavu skladovatelné po neomezeně dlouhou dobu.

P ř í k l a d 1

250 g slabě kyselého karboxylového katexu na bázi kopolymeru kyseliny metakrylové a divinylbenzenu - OSTION KM - se vnese do 500 ml dimethylformamidu. K suspenzi se přidá 0,1 mol trietanolaminu a 0,1 mol etylchloracetátu. Jako katalyzátoru se použije 0,1 g bromidu sodného. Suspenze se udržuje 2 hodiny při teplotě 120 °C. Poté se vzniklý reaktivní ester polymetakrylátu odfiltruje, promyje dimethylformamidem a vodou a vysuší se.

P ř í k l a d 2

250 g Ostionu KM se suspenduje v 500 ml acetonu a k suspenzi se přidá 0,1 mol triethylaminu, 0,1 p-nitrochlorbenzenu a 0,1 g bromidu sodného. Suspenze se zahřeje k varu a udržuje se při teplotě 6 hodin. Dále se postupuje obdobně, jak uvedeno v příkladu 1.

P ř í k l a d 3

250 g polyakrylového katexu - Amberlit CG 50 se suspenduje v 500 ml dimetylsulfoxidu a k suspenzi se přidá 0,1 mol pyridinu, 0,1 mol 2,4-dinitrochlorbenzenu a 0,1 g bromidu sodného. Suspenze se zahřívá k varu 6 hodin. Dále se postupuje obdobně jako v příkladu 1.

P ř í k l a d 4

100 g karboxymethylcelulózy se suspenduje v 500 ml dioxanu a k suspenzi se přidá 0,1 molu triethylaminu, 0,1 mol bromacetonitrilu a 0,1 g bromidu draselného. Suspenze se zahřeje k varu a udržuje se při této teplotě 4 hodiny. Dále se postupuje, jak uvedeno v příkladu 1.

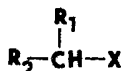
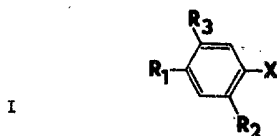
P ř í k l a d 5

Použití aktivovaného nosiče.

250 g nosiče připraveného postupem uvedeným v příkladech 1 - 4 se suspenduje v 800 ml pufru pH 7,5 s obsahem 40 mg/ml amyloglukosidázy. Suspenze se míchá při 30 °C 12 hodin. Poté se enzym vázaný kovalentní vazbou na nosič odfiltruje a promyje vodou. Aktivita vázaného enzymu činidla 60 EU/g a obsah bílkovin byl 30 mg/g.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob přípravy aktivovaného karboxylového nosiče pro immobilizaci enzymů, vyznačený tím, že se na 100 g karboxylového polymerního katexu založeného na bázi polyakrylátu, polymetakrylátu, polykarboxystyrénu, případně na bázi derivátů polysacharidů, suspendovaného v aprotickém organickém rozpouštědle působí při teplotě 20 až 120 °C 0,02 až 1,0 mol organického halogenidu vyjádřeného obecným vzorcem I nebo II



kde X je chlor, brom nebo jód

a alespoň jeden ze substituentů R_1 , R_2 , R_3 je $-\text{NO}_2$, $-\text{COOC}_2\text{H}_5$, $-\text{CN}$, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOC}_2\text{H}_5$, $-\text{CO}-\text{CH}_3$, přičemž ostatní mohou být $-\text{H}$,

po dobu 2 až 24 hod. v přítomnosti ekvimolekulárního množství terciárního alkylaminu, alkanolaminu, případně pyridinu a 0,01 až 1,0 g bromidu alkalického kovu.

2. Způsob přípravy podle bodu 1, vyznačený tím, že karboxylovým polymerním katexem je kopolymer kyseliny metakrylové a divinylbenzenu.

3. Způsob přípravy podle bodů 1 a 2, vyznačený tím, že aprotickým organickým rozpouštědlem je aceton, dimetylsulfoxid, dimetylformamid nebo jejich kombinace.