



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

222 968

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 29 05 79
(21) PV 3710-79
(89) 943 280, SU
(32)(31)(33) právo přednosti od 29 05 78
(2620877/23-04), SU

(51) Int. Cl. ~~G 07 G 7/02~~

CIN 1100

(40) Zveřejněno 30 11 82

(45) Vydáno 01 09 84

(73)

Autor vynálezu

KOZLOV LEONID VASILJEVIČ, KRYLOVA JULIJA IGNATJEVNA, MOSKVA,
KUDRJAVCEVA LJUDMILA VIKTOROVNA, SERPUCHOV, SUROVCEV VLADIMIR
IVANOVIČ, PUŠČINO NAD OKOU, SU

(54)

Způsob konzervace immobilizovaných enzymů

Způsob konzervace immobilizovaných enzymů je určen pro dlouhodobou úschovu a přepravu uvedených enzymů a lze jej použít v potravinářské mikrobiologické a zdravotnické výrobě.

Způsob sestává v lyofilním sušení enzymů za přítomnosti inertního a rozpustného ve vodě tuhého nosiče. Ve funkci nosiče lze použít anorganické soli, aminokyseliny, uhlovodany, polysacharidy, ve vodě rozpustné polymery a polyalkoholy.

222 968

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к авторскому свидетельству

МКИ²

Заявлено 29.05.78

С07 G 7/02

Заявка 2620877/23-04

A61K 37/48

Авторы изобретения : Л.В. Козлов, Ю.И. Крылова, Л.В. Кудрявцева,
В.И. Суровцов

Заявитель : Институт биоорганической химии им.
М.М. Шемякина АН СССР

СПОСОБ КОНСЕРВАЦИИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТОВ

Настоящее изобретение относится к способам консервации иммобилизованных ферментов, позволяющих 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 промышленности, 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.

Ближайшим по технической сущности является способ консервации иммобилизованных ферментов путем лиофильного высушивания суспензии иммобилизованного фермента, в частности, 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/.

Целью изобретения является уменьшение потерь активности фермента при высушивании.

Поставленная цель достигается тем, что перед высушиванием в 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.

Способ консервации иммобилизованных ферментов, согласно настоящему изобретению, заключается в лиофильном высушивании суспензии иммобилизованных ферментов в воде или буфере, в которую вносят инертный растворимый наполнитель при соотношении фермент, наполнитель 1:/1-20/.

222 988

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

Пример 1

20 мг пепсина свиньи, иммобилизованного на аэрополе, 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 колонне или с помощью центрифугирования.

Активность препаратов, определенная по гемоглобину в качестве субстрата, приведена ниже в виде процентного соотношения активности лиофильно высушенных препаратов к активности исходного препарата до лиофилизации:

1. без наполнения	9 %
2. с глицином в соотношении 10:1	16 %
3. с глицином в соотношении 20:1	25 %
4. с глюкозой в соотношении 1:1	50 %
5. с глюкозой в соотношении 10:1	53 %
6. с сахаром в соотношении 1:1	44 %
7. с сахарозой в соотношении 20:1	63 %
8. с поливинилпирролидоном / в.в. 25000/- - 1:1	67 %

9. с поливинилпирролидоном /м.в. 25000/ - 10:1	75 %
10. с декстраном /м.в. 500000/ -1:1	25 %
11. с полиэтиленгликолем /м.в. 3000/ -1:1	78 %
12. с NaCl в соотношении 1:1	21 %
13. с NaCl в соотношении 10:1	31 %
14. с NaCl в соотношении 20:1	35 %

Пример 2.

20 мг куриного пепсина, иммобилизованного на диатомите, консервируют аналогично иммобилизованному пепсину свиньи.

Активность по гемоглобину лиофильно высушенных препаратов:

- | | |
|------------------------------------|-----|
| 1. без наполнения | 50% |
| 2. с глицерином в соотношении 1 | 60% |
| 3. с глицерином в соотношении 10:1 | 67% |

Пример 3.

20 мг протосубтилина, иммобилизованного на сфероне АгА 1000, суспендируют в 1 мл 0,01 М фосфатного буфера, рН 8,0, и консервируют аналогично консервации иммобилизованного пепсина.

Активность лиофильно высушенных препаратов по гемоглобину:

222 968

- | | | |
|----|---|-----|
| 1. | без наполнения | 80% |
| 2. | с глюкозой в соотношении 1:1 | 93% |
| 3. | с полиэтиленгликолем
/м.в. 3000/-1:1 | 86% |

Пример 4.

20 мг протосубтилина, иммобилизованного на эзакриле АА, консервируют аналогично консервации протосубтилина, иммобилизованного на сфероне. Активность лиофильно высушенных препаратов по гемоглобину :

- | | | |
|----|---|------|
| 1. | без наполнения | 74% |
| 2. | с глюкозой в соотношении 1:1 | 100% |
| 3. | с полиэтиленгликолем
/м.в. 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 интерный растворимый наполнитель при соотношении фермент 1:/1-20/.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве интерного наполнителя используют неорганические соли, например поваренную соль.
3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве инертного наполнителя используют аминокислоты, например, глицин.

222 968

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 водорастворимые полисахароды, 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.

222 988

АННОТАЦИЯ

Способ консервации иммобилизованных белков предназначен для длительного хранения и транспортировки указанных белков и может быть использован в пищевой, микробиологической и медицинской промышленности.

Способ консервации иммобилизованных белков состоит в их лиофильном высушивании в присутствии инертного растворимого в воде твердого наполнителя.

В качестве наполнителя можно использовать неорганические соли, аминокислоты, углеводы, полисахариды, водорастворимые полимеры, полиспирты.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

222 968

1. Způsob konzervace immobilizovaných enzymů prostřednictvím lyofilního sušení jejich suspenze ve vodě nebo pufu, vyznačující se tím, že za účelem zmenšení ztráty aktivity enzymu během sušení se do suspenze přidává inertní rozpustný nosič v poměru enzymu : nosiči 1 : 1 až 20.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako inertní nosič používají anorganické soli, např. chlorid sodný.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako inertní nosič používají aminokyseliny, např. glycin.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že ve funkci inertního nosiče se používají uhlovodany, např. glukóza, sacharóza.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako inertní nosič používají ve vodě rozpustné polysacharidy, např. dextran.

6. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako inertní nosič používají polyalkoholy, např. polyetylénglykol.

7. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako inertní nosič používají ve vodě rozpustné syntetické polymery, např. polyvinylpyrrolidon.

Uznáno vynálezem na základě výsledků expertízy, provedené Státním výborem pro vynálezy a objevy SSSR, Moskva, SU