



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

232642
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 11/08

(22) Prihlášené 25 07 83
(21) (PV 5541-83)

(40) Zverejnené 18 06 84

(45) Vydané 15 12 86

(75)

Autor vynálezu

ZEMEK JIŘÍ ing. CSc., LEHNICE, KUNIAK EUDOVÍT ing. CSc.,
BRATISLAVA

(54) Spôsob imobilizácie biopolymérov a buniek

1

Vynález sa týka oboru biochémie, polymérnej chémie, mikrobiológie a biotechnológie.

Vynález rieši spôsob imobilizácie biopolymérov, predovšetkým proteínov peptidov, enzýmov a celých mikrobiálnych buniek.

Uvedeného účelu sa dosiahne tým, že príslušné biopolymérne látky, resp. celé mikrobiálne bunky sa rozpustia alebo suspendujú v roztoku polyetylénimínu tak, aby koncentrácia polyetylénimínu bola v roztoku 15 až 25 % hmotnostných a koncentrácie biologicky aktívneho proteínu alebo mikrobiálnych buniek 0,25 až 5 % hmotnostných, na čo sa homogenizovaný roztok alebo suspenzia zosieťuje bifunkčným sieťovacím reagentom, najlepšie s 2-chlormetyloxiránom, 1,6-diizotiokyanátom hexanu, 1,6-diizokyanátom hexanu, glutaraldehydom alebo chloridom kyseliny glutarovej po dobu 10 až 60 minút pri teplote 10 až 30 °C.

Vynález má využitie všade, kde je účelné imobilizovať biologicky aktívne látky, resp. celé bunky či už pre analytické, alebo priemyslové využitie.

Prihláška vynálezu sa týka spôsobu imobilizácie biologicky aktívnych biopolymérov, predovšetkým proteínov, peptidov, enzýmov a celých mikrobiálnych buniek.

Spôsoby imobilizácie biologicky aktívnych biopolymérov ako aj celých buniek sú po väčšine viacstupňové procesy, pozostávajúce z prípravy a aktivácie matrice k imobilizácii, adjustácie matrice pre vlastnú imobilizačnú reakciu a z odstránenia nezreagovaných východných látok a reakčných spodín. Nedostatkom väčšiny nosičov je pomerne nízky obsah funkčných skupín využiteľných k imobilizácii, resp. ich nerovnomerná distribúcia. Uvedené nedostatky čiastočne eliminuje využitie polyetylénimínu ako enzýmového nosiča [L. Kuniak, J. Zemek: AO č. 159,063; J. Zámocký, J. Zemek, L. Kuniak, Š. Kučár: AO 198 554; J. Zemek, L. Kuniak, P. Gemeiner, J. Zámocký, Š. Kučár: Enzyme Microb. Technol. 4, 233, [1982]], použité postupy sú však pomerne pracné, zosietený skelet enzýmového nosiča neumožňuje vytvorenie membrány alebo filmu s imobilizovaným enzýmom a v prípade, že by mali byť imobilizované celé bunky, výťažnosť imobilizačnej reakcie by bola veľmi nízka.

Uvedené nedostatky rieši principiálne nový vynález, a to rozpustením alebo suspendovaním imobilizovanej látky v roztoku polyetylénimínu a nasledovným zosietením uvedeného polyméru. Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje spôsob imobilizácie biopolymérov a buniek podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že do 100 hmotnostných dielov vodného roztoku polyetylénimínu o koncentrácii 30 až 50 % hmotnostných sa pridá 100 hmotnostných dielov vodného roztoku alebo suspenzie obsahujúce 0,5 až 10 % hmotnostných biopolymérov alebo celých buniek a po zhomogenizovaní reakčnej zmesi sa pridá 5 až 20 hmotnostných dielov bifunkčného sieťovacieho reagentu ako 2-chlormetyloxiránu, 1,6-diizokyanátu hexanu, 1,6-diizotiokyanátu hexanu, glutaraldehydu alebo chloridu kyseliny glutarovej, pričom reakcia prebieha 10 až 60 minút pri teplote 10 až 30 °C.

Výhodou nového spôsobu imobilizácie biopolymérov a celých buniek je jeho jednoduchosť, nakoľko netreba reakčnú zmes špeciálne upravovať, reakcia imobilizácie prebieha pri teplotách bežných v laboratóriách po krátku dobu, po skončení imobilizácie netreba gél nosiča osobitne adjustovať. Nakoľko pri imobilizácii dochádza jednak k imobilizácii kovalentnou väzbou, jednak k enkapsulácii biopolymérov do vnútornej štruktúry nosiča v dôsledku čoho je hmotnostný podiel biopolymérov, resp. celých buniek v polyetylénovom nosiči veľmi vysoký, až 30 % a tým aj vysoká účinnosť imobilizácie. Nezanedbateľnou výhodou je aj nízka cena základného polyméru.

Uvedený spôsob imobilizácie nie je však vyhovujúci pre tie biosystémy, ktoré sú v al-

kalickom prostredí polyetylénimínu deaktivované (napr. pepsin).

Príklad 1

2,25 g polyetylénimínu (0,02 mol) o koncentrácii 40 % hmotnostných a strednej molekulovej hmotnosti 40 000 sa zmieša s 2,25 gramu suspenzie enzýmu glukózooxidázy (EC 1.1.3.4), obsahujúcej 0,0225 g enzýmového glykolproteinu, 0,05 g albumínu hovädzieho séra vo fosfátovom pufrí (10,0 mmól/l; pH 7,8) a po dôkladnom premiešaní na elektromagnetickej miešačke (10 min.) sa pridá 0,112 g 2-chlormetyloxiránu. Po 10 minútach a pri teplote 30 °C sa ztuhlý gél imobilizovaného enzýmu dezintegruje v mixéri, premyje na filtri so 100 ml destilovanej vody a nechá sa vysušiť. Výťažok proteínu pri imobilizácii 0,021 g, t. j. 93 %. Pokles celkovej aktivity glukózooxidázy v priebehu imobilizácie je z 0,2 μ kat na 0,17 μ kat.

Príklad 2

19 g vodného roztoku polyetylénimínu o koncentrácii 10 % hmotnostných sa zmieša s 0,095 g suspenzie permeabilizovaných buniek *Wingea robertsii* s xylózoizomerázovou aktivitou (4 μ kat/g biomasy) v 0,9 ml destilovanej vody. Po dôkladnom premiešaní na elektromagnetickej miešačke sa pridá 1,8 g 1,6-diizotiokyanátu hexanu a nechá sa reagovať po dobu 15 minút pri teplote 10 °C. Po vysušení sa získa 3,1 g suchého gélu o aktivite xylózaizomerázy 90 nkat/g získaného gélu.

Príklad 3

Tak ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že sa vychádza z 5 g vodného roztoku polyetylénimínu a vlastná imobilizácia sa prevedie s 0,2 g 1,6-diizokyanátu hexanu, pri teplote 22 °C po dobu 12 minút. Pokles aktivity glukózooxidázy v priebehu imobilizácie je z 0,2 μ kat na 0,18 μ kat.

Príklad 4

Tak ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že sa vychádza v 10 g vodného roztoku polyetylénimínu, pridá sa 2,5 g glukózooxidázy a po dôkladnom premiešaní na elektromagnetickej miešačke sa pridá 0,2 g glutaraldehydu. Po 15 minútach a pri teplote 30 °C je reakcia skončená, pričom pokles celkovej aktivity glukózooxidázy je z 0,2 μ kat na 0,15 μ kat.

Príklad 5

Tak ako je uvedené v príklade 4 s tým rozdielom, že namiesto glutaraldehydu sa použije 0,2 g chloridu kyseliny glutarovej a namiesto glukózooxidázy sa použije ace-

tylcholínesteráza (0,1 g EC 3.1.1.7) o špecifickej aktivite nkat/mg. Pokles celkovej aktivity acetylcholínesterázy v priebehu imobilizácie bol za 7 μ kat na 5,94 μ kat, t. j. o 15 %.

Vynález má využitie všade, kde je potrebné imobilizovať biologicky aktívne látky, resp. celé bunky či už pre analytické, alebo priemyslové využitie.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob imobilizácie biopolymérov a buniek vyznačený tým, že do 100 hmotnostných dielov vodného roztoku polyetylénimínu o koncentrácii 30 až 50 % hmotnostných sa pridá 100 hmotnostných dielov vodného roztoku alebo suspenzie obsahujúce 0,5 až 10 % hmotnostných biopolymérov alebo celých buniek a po zhomogenizovaní reakčnej

zmesi sa pridá 5 až 20 hmotnostných dielov bifunkčného sieťovacieho reagentu ako 2-chlormetyloxiránu, 1,6-diizokyanátu hexanu, 1,6-diizotiokyanát hexanu, glutaraldehydu alebo chloridu kyseliny glutarovej, pričom reakcia prebieha 10 až 60 minút pri teplote 10 až 30 °C.