



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

232784
(11) (B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 11/10

(22) Přihlášeno 27 09 82
(21) {PV 6895-82}

(40) Zveřejněno 17 07 84

(45) Vydáno 15 01 87

[75]

Autor vynálezu

MAREK MIROSLAV ing. CSc., DĚČÍN, VALENTOVÁ OLGA RNDr. CSc.,
VODRÁŽKA ZDENĚK doc. ing. DrSc., MAREK MILOŠ doc. ing. CSc.,
JARÝ JIŘÍ prof. ing. DrSc., STANĚK JAN RNDr. CSc.,
KEFURT KAREL ing. CSc., HEŘMÁNKOVÁ VĚRA ing., PRAHA

(54) Způsob přípravy biokatalyzátoru s imobilizovaným enzymovým systémem

1

2

Vynález se týká způsobu přípravy biokatalyzátoru s imobilizovaným enzymovým systémem, který spočívá v tom, že se imobilizovaný systém vytvoří vzájemnou reakcí enzymů, z nichž nejméně jeden ve formě vlastního nebo vytvořeného glykoproteinu obsahuje aktivovanou cukernou složku nebo reakcí enzymů s aktivovaným oligo- nebo polysacharidem, přičemž se na nosič imobilizuje nejdříve jedna z reagujících složek nebo reakcí vzniklý oligomer jako celek. Aktivace cukerné složky glykoenzymu se provede jodistanovým štěpením vicinálních diolů a spojení příslušných enzymů přímou reakcí vzniklých aldehydových skupin s aminoskupinami jiného enzymu nebo pomocí Ugiho čtyřkomponentní kondenzace.

Z hlediska využití jednotlivých enzymů zúčastněných na tvorbě biokatalyzátoru je způsob dle vynálezu zvláště vhodný pro kombinaci enzymů s různou velikostí efektivního poloměru molekul. Důsledkem tvorby enzymového komplexu je zvýšená rychlost reakce a zvýšená odolnost proti deaktivaci zvláště v těch případech, kdy produkt určitého reakčního mezistupně působí na některý z enzymů inhibičně.

Vynález se týká způsobu přípravy biokatalyzátoru s imobilizovaným enzymovým systémem.

Enzymy, zvláště v imobilizované formě, představují velmi účinné biokatalyzátory vysoce specifických reakcí, které probíhají za fyziologických podmínek, tj. při normálních hodnotách pH, teploty, tlaku apod.

V řadě případů představuje produkt jedné reakce zároveň substrát dalšího enzymu, takže použitím několika enzymů je možno převádět výchozí látku řadou specifických enzymových reakcí na žádaný produkt. Společnou imobilizací potřebných enzymů je pak připraven biokatalyzátor schopný katalýzy daného sledu reakcí.

Z těchto důvodů byla v řadě prací věnována pozornost společné imobilizaci dvou i více enzymů, ať již kovalentní vazbou na různé nosiče, či společným zabudováním do matrice gelu apod. U vzniklých biokatalyzátorů je žádoucí, aby se aktivní místa molekul enzymů katalyzujících následné reakce nacházela vzájemně v co největší blízkosti, aby reakční rychlost, respektive sled jednotlivých reakcí byl co nejméně zpomalován difúzními jevy, respektive transportem meziproduktů od jednoho enzymu ke druhému. U řady enzymů zvláště v technologických aplikacích, kdy jsou používány vyšší koncentrace substrátů, pod vlivem vznikajících produktů reakce dochází k inaktivaci daného enzymu. V těchto případech je třeba daný produkt (ať již vedlejší produkt, či meziprodukt sledu katalyzovaných reakcí) odstraňovat z reakční směsi, s výhodou katalytickým účinkem dalšího enzymu. Zde je zvláště důležité, aby tento enzym byl v těsné blízkosti tvorby inhibicí způsobujícího produktu předchozí reakce. Určitým řešením tohoto problému je společná imobilizace obou enzymů. Výraznějšího efektu z hlediska odstraňování inhibicí způsobujícího produktu či zvýšení rychlosti průběhu jednotlivých následných reakcí je dosaženo přípravou biokatalyzátoru, u něhož je imobilizován komplex enzymů vzájemně spojených kovalentní vazbou.

Způsob přípravy biokatalyzátoru s imobilizovaným enzymovým systémem podle vynálezu spočívá v tom, že se imobilizovaný systém vytvoří vzájemnou reakcí enzymů, z nichž nejméně jeden ve formě vlastního nebo vytvořeného glykoproteinu obsahuje aktivovanou cukernou složku nebo reakcí enzymů s aktivovaným oligo nebo polysacharidem, přičemž se na nosič imobilizuje nejdříve jedna z reagujících složek nebo reakcí vzniklý oligomer.

Způsobem podle vynálezu je požadovaného spojení enzymových aktivit dosaženo v případě, kdy se jedná alespoň u jednoho enzymu o glykoprotein, aktivací cukerné složky glykoenzymu jodistanovým štěpením a reakcí vzniklých aldehydových skupin s aminoskupinami druhého enzymu. Spojení obou enzymů je možno s výhodou též do-

sáhnout pomocí Ugiho čtyřkomponentní kondenzace. V případě dvou či více enzymů neobsahujících cukernou složku je možno aplikovat shodný postup po předchozím vytvoření glykoproteinu reakcí enzymu s aktivovaným oligo- či polysacharidem.

Způsobem podle vynálezu je možno na imobilizování enzymu navázat glykoprotein přes svoji aktivovanou cukernou složku, případně se nejdříve provede imobilizace glykoproteinu s aktivovanou cukernou složkou a poté následuje navázání doplňkových enzymů reakcí s nezreagovanými aktivními skupinami cukerné složky glykoproteinu. Dále je možno vytvořit reakci glykoenzymu majícího aktivovanou cukernou složku s doplňkovým enzymem glykoproteinový oligomer, který je poté vhodným způsobem imobilizován. Tvorba homooligomeru do značné míry závisí na charakteru jednotlivých enzymů, jejich vzájemném poměru a podmínkách reakce.

Výhoda způsobu přípravy biokatalyzátoru s imobilizovaným enzymovým systémem dle vynálezu spočívá v šetrnosti a snadné technické realizovatelnosti použité metody. Předností je též vysoká stabilita enzymového systému spočívající v tvorbě komplexu glykoproteinů. Důsledkem je pak zvýšená rychlost reakce a zvýšená odolnost vůči deaktivaci. Z hlediska využití jednotlivých enzymů zúčastněných na tvorbě biokatalyzátoru je způsob dle vynálezu zvláště vhodný pro kombinaci enzymů s různou velikostí efektivního poloměru molekul.

Vynález je dokumentován příklady použití.

Příklad 1

Roztok glukosaoxidasy (β -D-glukosa: Oxidoreduktasa, EC 1.1.3.4, GOD) ve formě preparátu Spoliasa GCL-75 z plísňe *Aspergillus niger* (Středočeská Fruta a. p., závod droždárna Kolín) o obsahu 130 mg bílkoviny (stanoveno dle Lowryho) ve 260 ml 0,1 M acetátového pufru pH 5 byl oxidován 10 ml 0,05 M jodistanem sodným po dobu 4 hodin za nepřístupu světla při 4 °C. Přbytek jodistanu byl odstraněn přidávkou 0,08 mlilitru ethylenglykolu. Po 0,5 hodinách třepání byla reakční směs dialyzována 18 hodin proti 5 l 0,05 M fosfátového pufru pH 7.

K uvedenému množství oxidované glukosaoxidasy bylo přidáno 5 g glycidylmethakrylátového gelu modifikovaného 1,6-diaminohexanem (G-70, HMDA) a směs byla třepána 16 hodin při 4 °C. K získanému konjugátu byl po promytí 0,01 M fosfátovým pufrům pH 7 přidán roztok 0,4 ml katalázy (1 gram v 21,8 ml) ve 100 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7. Po dalších 16 hodinách třepání při 4 °C byl konjugát promýván střídavě 0,01 M fosfátovým pufrům pH 7 a 1 M NaCl v tomto pufru do vymizení katalázové aktivity ve filtrátu. U získaného konju-

gátu byla zjištěna glukosaoxidasová aktivita 0,8 ukat/g suchého materiálu a katalázová aktivita 600 ukat na g suchého materiálu.

Příklad 2

Ke 100 ml 0,1 M fosfátového pufru pH 7 bylo přidáno 0,4 ml katalázy (1 g ve 28,8 mililitrech) a poté 10 g glycidylmethakrylátového gelu modifikovaného 1,6-diaminohexanem a aktivovaného glutaraldehydem. Po 16 hodinách při 4°C byl konjugát promyt 0,01 M fosfátovým puftrem pH 7. Po přidání 200 ml oxidované glukosaoxidasy (viz příklad 1) byla směs opět třepána 16 hodin při 4°C a poté promyta střídavě 0,01 M fosfátovým puftrem pH 7 a 1 M NaCl v tomto pufru do vymizení glukosaoxidasové aktivity ve filtrátu. U získaného konjugátu byla zjištěna katalázová aktivita 1207 ukat/g su-

chého materiálu a glukosaoxidasová aktivita 1,1 ukat/g sušiny.

Příklad 3

K 240 ml oxidované glukosaoxidasy (viz příklad 1) bylo přidáno 1,2 ml koncentrovaného preparátu katalázy (1 g/21,8 ml) a po 16 hodinách třepání 10 g glycidylmethakrylátového gelu modifikovaného 1,6-diaminohexanem (G-70-HMDA) a aktivovaného glutaraldehydem. Po 16 hodinách třepání při 4°C byl získaný konjugát promýván střídavě 0,01 M fosfátovým puftrem pH 7 a 1 M NaCl v tomto pufru do vymizení katalázové aktivity ve filtrátu. Získaný konjugát vykazoval glukosaoxidasovou aktivitu 1 ukat/gram suchého nosiče a katalázovou aktivitu 1270 ukat/g suchého nosiče.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy biokatalyzátoru s imobilizovaným enzymovým systémem, vyznačující se tím, že se imobilizovaný systém vytvoří vzájemnou reakcí enzymů, z nichž nejméně jeden ve formě vlastního nebo vytvořeného glykoproteinu obsahuje aktivovanou cukernou složku nebo reakcí enzymů s aktivovaným oligo- nebo polysacharidem, přičemž se na nosič imobilizuje nejdříve jedna z reagujících složek nebo reakcí vzniklý oligomer jako celek.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačujících se tím, že se aktivace cukerné složky glykoproteinu nebo oligo- nebo polysacharidu provede oxidativním jodistanovým štěpním vicinálních diolů.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se enzymy vážou na glykoproteiny nebo oligo- nebo polysacharidy přímou reakcí aminoskupin s aldehydovými skupinami vytvořenými aktivací cukerných jednotek nebo prostřednictvím Ugiho čtyřkomponentní kondenzace.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se provede nejprve imobilizace glykoproteinu s aktivovanou cukernou složkou na vhodný nosič a poté následuje navázání doplňkových enzymů reakcí s nezreagovanými aktivními skupinami cukerné složky glykoproteinu.

5. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se provede imobilizace enzymu, na který se naváže jeden nebo více typů glykoproteinů přes svoji aktivovanou cukernou složku.

6. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se vytvoří reakcí glykoproteinu majícího aktivovanou cukernou složku s doplňkovým enzymem glykoproteinový oligomer, který se poté imobilizuje.

7. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se reakcí několika enzymů s aktivovaným oligo- nebo polysacharidem vytvoří glykoproteinový oligomer, který se poté imobilizuje.