

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

90211

Patent dodatkowy
do patentu _____

MKP C07g 7/02

Zgłoszono: 02.03.71 (P. 146602)

Pierwszeństwo: _____

Int. Cl². C07G 7/02

Zgłoszenie ogłoszono: 30.05.73

Opis patentowy opublikowano: 31.05.1977



Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Koninklijke Nederlandsche Gist-en Spiritus-fabriek N.V.,
Delft (Holandia)

Sposób wytwarzania kompozycji enzymatycznej

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania bardzo użytecznej kompozycji enzymatycznej, którą można stosować w środkach piorących.

Kompleksy enzymów są znane i na przykład opisano je w Chem.Abstr. 65 (1966) 14394e/f, gdzie omówiono patent japoński Nr 7833/66, obejmujący kompleks enzymu i taniny. Kompleks ten jest jednak raczej nietrwały i trudno jest go przemywać, co powoduje, że oczyszczanie enzymu po oddzieleniu z pożywki hodowlanej jest trudne.

Znane są także pochodne enzymów z wysokocząsteczkowymi związkami, jak na przykład związek otrzymywany poprzez reakcję rozpuszczonego enzymu zawierającego wolne grupy aminowe z reaktywnym estrem będącym produktem reakcji soli 3-(niepodstawionej)izoksazoliowej i polimeru zawierającego grupy karboksylowe. Metodę tę opisano w patencie brytyjskim nr 1191149. Związek otrzymany według tego patentu jest jednak związkiem, w którym polimer jest chemicznie związany wiązaniami kowalencyjnymi z enzymem. Jest to związek nierozpuszczalny i dlatego nie nadaje się do zastosowania w środkach piorących, gdyż po płukaniu może dawać pozostałość po praniu.

Przedmiotem tego wynalazku jest sposób wytwarzania kompozycji enzymatycznej, którą można łatwo oczyszczać prostą metodą mycia, najlepiej bezpośrednio z bulionu fermentacyjnego, przy czym kompozycja ta jest tylko nieznacznie zabarwiona, wykazuje tylko słaby zapach i ponadto można ją stosować w środkach piorących takim samym, typowym sposobem jak niezwiązane enzymy.

Opracowano metodę wytwarzania kompozycji enzymatycznej polegającą na tym, że wodny roztwór enzymu kontaktuje się z rozpuszczonym polimerem rozpuszczalnym w wodnym roztworze ługu i posiadającym prosty lub rozgałęziony łańcuch węgiel-węgiel z odpowiednio rozmieszczonymi w tym łańcuchu grupami karboksylowymi. Polimer ten może jako dodatkowe podstawniki zawierać ewentualnie grupy węglowodorowe, a łańcuch węglowy i/lub podstawniki węglowodorowe mogą ewentualnie zawierać heteroatomy, a zwłaszcza atomy tlenu, pomiędzy atomami węgla. Średni ciężar cząsteczkowy tego polimeru wynosi co najmniej 10000, pH uzyskanej mieszaniny ustala się pomiędzy około 2-9 w taki sposób, żeby wytrącił się osad i osad ten oddziela się. Korzystne jest, aby wodny roztwór enzymu pochodził z przesączonego bulionu lub ekstraktu komórkowego. W celu uzyskania dającego się dobrze płukać osadu korzystne jest ustalenie pH, około 2-6. Produkt

otrzymywany według sposobu tego wynalazku można stosować w środkach piorących tak samo jak nie związane enzymy.

Jako polimer w sposobie według wynalazku można stosować dowolny polimer zawierający grupy $-\text{CHXCY}(\text{COOH})-$, w których X oznacza atom wodoru lub grupę karboksylową, a Y oznacza atom wodoru lub grupę metylową. Polimer ten może być skopolimeryzowany z jednym lub więcej innymi monomerami lub ich częściowymi, niższymi estrami lub amidami alkilowymi. Dobrymi polimerami są tu polimery kwasu akrylowego lub metakrylowego z grupami karboksylowymi lub kopolimery kwasu akrylowego, metakrylowego lub maleinowego z grupami karboksylowymi z takimi konomerami jak styren, etylen lub eter metylowinylowy. Szczególnie użyteczny jest polimer składający z merów kwasu maleinowego i styrenu. Częsteczkowy stosunek merów kwasu maleinowego i styrenu wynosi około 3 : 1 do 1 : 3, a korzystnie około 3 : 2 do 2 : 3. Średni ciężar cząsteczkowy polimeru wynosi powyżej 20000, korzystnie 20000. Szczególnie odpowiednim polimerem jest polimer dostępny na rynku w postaci wodnego roztworu pod nazwą G-942 (E.I. Du Pont de Nemours Co), w którym cząsteczkowy stosunek merów styrenu do merów kwasu maleinowego wynosi około 1 : 1, a jego średni ciężar cząsteczkowy wynosi powyżej 10000.

Polimery, które można stosować w sposobie według wynalazku podał Graves w patencie Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej 2205882 i Kirk w patencie Stanów Zjednoczonych Ameryki Północnej, nr 2205901.

Kompozycja otrzymywana sposobem według wynalazku jest względnie czysta i w stosunku do typowych enzymów ma przyjemniejszy zapach i zabarwienie oraz wyższą aktywność w przeliczeniu na masę. Nieoczekiwanie, kompozycja nie traci i nie zmienia tych pożądanych i korzystnych właściwości po wprowadzeniu jej do środków piorących. Innymi zaletami enzymatycznej kompozycji otrzymanywaną sposobem według wynalazku w stosunku do typowych enzymów jest jej mniejsza toksyczność i słabsze działanie alergiczne połączone z większą trwałością.

Środek piorący zawierający kompozycję enzymatyczną otrzymywaną sposobem według wynalazku ma co najmniej takie samo działanie piorące jak równoważna ilość środka piorącego zawierającego enzym wytwarzany typowym sposobem i wykazujący taką samą aktywność enzymatyczną wyrażoną w jednostkach „Delft” (jednostki Delft = j.D. oznacza się opisany poniżej sposobem).

W sposobie według wynalazku stosuje się kompozycje pochodzące z enzymów używanych powszechnie w środkach piorących, takich jak proteazy, na przykład wytwarzane przez gatunki *Bacillus*, takie jak MAXATASE (rejestrwana nazwa handlowa) lub ALCALASE (rejestrwana nazwa handlowa). Te proteazy wytwarzane przed lub po otrzymaniu kompozycji można mieszać z amylazami, lipazami lub podobnymi enzymami. Wynalazek obejmuje również sposób wytwarzania kompozycji z innymi enzymami, nie stosowanymi zazwyczaj w środkach piorących, a zwłaszcza typu amylaz, lipaz, jak również dehydrogenaz alkoholu, karboksylaz itp.

Jak wykazano powyżej, osad oddziela się po uregulowaniu wartości pH roztworu. Oddzielanie osadu przeprowadza się dowolną znaną metodą, jak na przykład przez odsączenie lub odwirowanie, przemycie i wysuszenie enzymatycznej kompozycji. Do przemywania można stosować takie rozpuszczalniki lub ich mieszaniny, które w istotny sposób nie rozpuszczają lub nie rozkładają kompozycji. Zazwyczaj nadają się do tego celu rozpuszczalniki organiczne, takie jak aceton i alkohol etylowy. Wysuszoną kompozycję można otrzymywać w postaci wolno płynącego proszku, który daje się łatwo wprowadzić do środków piorących.

Ilość polimeru stosowanego do wytworzenia enzymatycznej kompozycji w sposobie według wynalazku zależy od właściwości enzymu i jego stężenia oraz od właściwości polimeru. Na tworzenie się kompozycji wpływają również takie czynniki jak pH, obecność soli, ładunki elektrostatyczne enzymu i polimeru itp. Ilość polimeru niezbędna do optymalnego tworzenia się kompozycji zależy również od innych czynników, jak na przykład od stężenia roztworu enzymu. W przypadku użycia na przykład roztworu G-942 zawierającego około 25% polimeru i enzymu MAXATASE zaleca się zastosowanie około 0,5 do 3% wagowych polimeru na objętość enzymu przeliczonego na roztwór o aktywności 100000 j.D./g. Do celów specjalnych można stosować inne ilości polimeru.

Enzymatyczne kompozycje otrzymywane sposobem według wynalazku można następnie, a zwłaszcza po przemyciu, poddać reakcji z jonem metalu. Odpowiednimi jonami są jony metali trójwartościowych, takich jak glin, żelazo i chrom lecz można również stosować jony metali o innych wartościowościach, takich jak cyrkon.

Produkt otrzymywany sposobem według wynalazku można stosować w środkach piorących.

Aktywność enzymatyczną substancji czynnych wyraża się w jednostkach, przy czym za jednostkę przyjmuje się taką ilość enzymu, która jest zdolna do przeprowadzenia specyficznej reakcji chemicznej w pewnym okresie czasu. Na oznaczenie aktywności duży wpływ mają warunki reakcji. Korzystnie aktywność oznacza się w takich warunkach, jakie stosuje się w roztworze piorącym. Ponieważ pewne proteazy stosuje się w proszkach do prania, dlatego też oznaczanie prowadzi się w obecności trójpolifosforanu sodowego, znajdującego

go się w większości tych proszków. Wartość pH i temperaturę dostosowuje się do warunków prania. Aktywność wyrażoną w jednostkach „Delft” (j.D.) oznacza się na kazeinie. Trwałość wodnego roztworu enzymu określa się oznaczając w odpowiednich odstępach czasu aktywność roztworu.

W tym celu 130 g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ rozpuszcza się w wodzie destylowanej do objętości 3000 ml otrzymując odczynnik 1. 42 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ rozpuszcza się w wodzie destylowanej do łącznej objętości 3000 ml otrzymując odczynnik 2. 63 g NaHCO_3 rozpuszcza się w wodzie destylowanej do łącznej objętości 3000 ml, otrzymując odczynnik 3. Mieszaninę odczynników 1, 2 i 3 w ilości po 100 ml uzupełnia się wodą destylowaną do łącznej objętości 10000 ml otrzymując odczynnik 4 o twardości 15° niemieckich. 36,34 g trój-(hydroksymetylo)amino-metanu rozpuszcza się w odczynniku 4 do łącznej objętości 1000 ml otrzymując odczynnik 5. Mieszaninę 1000 g trójpolifosforanu sodowego, 500 ml odczynnika 1, 500 ml odczynnika 2 i 500 ml odczynnika 3 rozpuszcza się w 48,5 litrach wody destylowanej i doprowadza pH roztworu do wartości 8,5 dodając odpowiednią ilość 10% roztworu HCl, przy czym otrzymuje się odczynnik 6. 540 g kwasu tróchlorooctowego rozpuszcza się w wodzie destylowanej do łącznej objętości 3000 ml, otrzymując odczynnik 7. 900 g octanu sodowego $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, rozpuszcza się w wodzie destylowanej do łącznej objętości 3000 ml otrzymując odczynnik 8. 900 ml kwasu octowego rozpuszcza się w wodzie destylowanej do łącznej objętości 3000 ml otrzymując odczynnik 9. 2,5 ml Tween-80 rozpuszcza się w wodzie destylowanej do łącznej objętości 50 ml otrzymując odczynnik 10. 100 ml odczynnika 7, 100 ml odczynnika 8, 100 ml odczynnika 9 i 4 ml odczynnika 10 miesza się razem w podanej kolejności i rozcieńcza wodą destylowaną do łącznej objętości 1000 ml otrzymując odczynnik 11. Roztwór substratu kazeiny otrzymuje się następująco: 36,0 kazeiny (firmy Merck, do celów biochemicznych) rozpuszcza się w 2,5 litrach odczynnika 4 mieszając, po czym roztwór miesza się jeszcze w ciągu 10 minut, dodaje 300 ml odczynnika 5 i całość miesza się w ciągu 10 minut. Po czym mieszaninę miesza się i ogrzewa do temperatury 40°C na łaźni wodnej o temperaturze 70°C . W temperaturze 40°C mieszaninę alkalinizuje się do wartości pH 8,5, dodając 1n roztwór NaOH. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej objętość mieszaniny uzupełnia się do 3 litrów odczynnikiem 4 i całość miesza się. Tak otrzymany odczynnik 12 jest trwały w ciągu 1 dnia, przy przechowywaniu w lodówce.

W celu oznaczenia aktywności proteazy odważoną ilość homogenicznego preparatu enzymatycznego rozpuszcza się w odpowiedniej ilości odczynnika 6 i roztwór alkalinizuje do pH 8,5, dodając w temperaturze pokojowej 1n roztwór NaOH lub HCl. Stężenie enzymu w roztworze dobiera się tak, aby aktywność roztworu wynosiła 20–30 jednostek Delft (j.D.) proteazy na mililitr. Roztwór ten jest trwały w ciągu najwyżej 2 godzin. Roztwór enzymu, roztwór kazeiny i próbówki ogrzewa się na łaźni wodnej do temperatury $40^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$. Do próbówki dodaje się więc 1 ml roztworu enzymu, a gdy osiągnie on temperaturę 40°C dodaje się 5 ml roztworu kazeiny i dokładnie miesza. Czas reakcji wynosi dokładnie 40 minut, po czym wkrapla się 5 ml odczynnika 11 i razem miesza. Probówkę umieszcza się na łaźni wodnej na okres 30 minut w celu skoagulowania wytrąconego osadu, który następnie odwirowuje się w ciągu 15 minut.

Dla wszystkich roztworów enzymów przeprowadza się próbę ślepą, dodając do próbówki 5 ml odczynnika 11 i ogrzewając go do temperatury 40°C , a następnie dodając 1 ml roztworu enzymu oraz 5 ml roztworu kazeiny. Zawartość próbówki miesza się dokładnie i po skoagulowaniu osadu w ciepłej łaźni wodnej w ciągu 30 minut odwirowuje się go w ciągu 15 minut. Następnie mierzy się gęstość optyczną roztworu w świetle ultrafioletowym przy długości fali 275 milimikronów w odniesieniu do wody destylowanej na spektrofotometrze. Różnica gęstości optycznych badanego roztworu i ślepej próby (OD) powinna wynosić około 0,4–0,6. W przypadku, gdy ta różnica jest większa lub mniejsza oznaczenie powtarza się, stosując bardziej rozcieńczony lub stężony roztwór enzymu. Aktywność enzymu, wyrażoną w jednostkach Delft, j.D./gram substancji zawierającej enzym oblicza się według następującego wzoru:

$\text{j.D./g} = \text{OD} \times 11 \times \text{współczynnik rozcieńczenia} \times 4,545$, w którym 11 oznacza stopień rozcieńczenia roztworu enzymu przez roztwór kazeiny i odczynnik 11, współczynnik rozcieńczenia oznacza iloraz całkowitej liczby mililitrów roztworu enzymu i wagi próbki w gramach, a 4,545 oznacza współczynnik przemiany.

Sposób według wynalazku przedstawiono w przykładach wykonania.

Przykład 1. Surową proteazę wytworzoną przez *Bacillus subtilis* rozpuszcza się w wodzie w takiej ilości, aby uzyskać roztwór o stężeniu 100000 j.D./ml i zobojętnia do pH 7. Do roztworu tego dodaje się 10% objętościowych (15% wagowych) wodnego roztworu polimeru o nazwie handlowej G-942 stanowiącego 24–26% wodny roztwór kopolimeru, kwasu maleinowego i styrenu w stosunku 1 : 1. Po dodaniu roztworu kopolimeru do roztworu enzymu wytwarza się niewielka ilość osadu. Mieszaninę miesza się i zakwasza do pH 5, dodając rozcieńczony roztwór HCl, w wyniku czego powstaje dużo osadu stanowiącego kompleks proteazy i polimeru. Otrzymaną zawiesinę miesza się w ciągu 1 godziny, osad odsącza się. Otrzymany osad przemywa się mieszając z odpowiednią ilością acetonu i ponownie odsącza. Po wysuszeniu otrzymuje się kompozycję proteazy o czystości 2–4 razy większej niż kompozycja otrzymana z surowego materiału wyjściowego.

Poniżej przedstawiono różnice własności kompozycji proteazy otrzymanej sposobem według wynalazku i proteazy otrzymanej w sposób konwencjonalny.

Każdą z kompozycji rozpuszcza się w wodzie w takiej ilości, aby otrzymać roztwór o aktywności enzymatycznej równej 100000 j.D./ml, dodając równocześnie rozcieńczony roztwór wodorotlenku sodowego tak, aby utrzymać wartość pH 9. Następnie dodaje się rozcieńczony roztwór chlorku N,N-dwumetylo-N-benzylu-N-(t-oktylofenoksyetoksyetylo)-amoniowego o nazwie handlowej Hyamine 1622. Z roztworu kompozycji otrzymanej w sposób opisany powyżej wytrąca się osad, podczas gdy w roztworze enzymu otrzymanego w inny sposób osad się nie tworzy. W ślepej próbie zawierającej środek garbujący, a nie zawierającej enzymu, po dodaniu Hyamine 1622 osad wytrąca się również. Pozwala to na przypuszczenie, że środek garbujący stanowi część kompozycji proteazy otrzymanej zgodnie ze sposobem opisanym w tym przykładzie.

Kompozycje proteazy otrzymanej w powyższy sposób porównywano z preparatem konwencjonalnym za pomocą testu elektroogniskowania opisanym przez H. Haglund'a w Science Tools 14, Nr 2, str. 17 (1967). Badając kompozycję otrzymaną sposobem opisanym w niniejszym przykładzie otrzymuje się ciało stałe w obszarze niższego pH, które to ciało stałe po oddzieleniu i rozpuszczeniu w wodzie o wyższym pH daje osad z Hyamine 1622. Widmo w świetle ultrafioletowym dla tego roztworu jest identyczne z widmem rozcieńczonego roztworu polimeru G-942. Stwierdzono, że w przypadku enzymu konwencjonalnego nie otrzymuje się w danym zakresie pH ciała stałego i dodanie Hyamine 1622 nie powoduje wytrącenia się osadu. Test powyższy wykazuje, że kompozycja otrzymana w tym przykładzie różni się od znanych preparatów enzymatycznych tym, że enzym jest w niej związany w kompleks z polimerem.

Kompozycje enzym-polimer otrzymaną opisywanym sposobem dodaje się w ilości 2000 j.D./g do środka piorącego zawierającego 54 części wagowe bezwodnego siarczanu sodowego, 24 części wagowe trójpolifosforanu sodowego, 6 części wagowych pirofoforanu sodowego, 10 części wagowych kwaśnego węglanu sodowego, 2 części wagowe karboksymetylocelulozy, 4 części wagowe dwualkilofenoksypoli-(etylenoksy)-etanolu. Tak otrzymany środek piorący ma takie same własności piorące jak środek, w którym kompozycje enzymu zastąpiono preparatem enzymatycznym otrzymanym w sposób konwencjonalny. Środek piorący o składzie podanym powyżej zawierający kompozycje enzymu jest bardziej klarowny i pachnie mniej niż podobny preparat piorący zawierający enzymy otrzymane w sposób konwencjonalny.

W celu oznaczenia własności piorących przeprowadzono test prania stosując środek piorący o wyżej wymienionym składzie, ale ze zmienną ilością kompozycji enzymatycznej. Przygotowano serię próbek zawierających 0, 250, 500, 1000 i 2000 j.D./g kompozycji enzymatycznej otrzymanej sposobem opisanym w niniejszym przykładzie oraz drugą serię próbek zawierających 0, 250, 500, 1000 i 2000 j.D./g enzymu przygotowanego w sposób konwencjonalny. Do prania użyto kawałki tkaniny EMPA-116, otrzymane z Eidgenössische Material Prüfungs-und Versuchsanstalt für Industrie, Bauwesen und Gewerbe, Skt. Gallen, Szwajcaria, o wymiarach 5x5 cm ubrudzone krwią, mlekiem i sadzą. Roztwór piorący przygotowano rozpuszczając 4 g środka piorącego w spreparowanej wodzie będącej odczynnikiem 4 uzupełniając tę wodę do objętości 1 litra. Kolby Erlenmeyera o pojemności 300 ml, zawierające 250 ml roztworu piorącego umieszcza się na łaźni wodnej w temperaturze 45°C. Do każdej kolby wkłada się kawałek tkaniny pozostawiając ją do zamoczenia w ciągu dokładnie 1 godziny w temperaturze 45°C, mieszając kolby w odstępach 10 minutowych. Po usunięciu roztworu piorącego dolewa się 250 ml standardowej wody bieżącej, następnie kolby zamyka się korkiem gumowym i energicznie wytrząsa w ciągu 1 minuty. Następnie wszystkie kawałki tkaniny zbiera się w zlewce i płucze pod wolno spływającą wodą bieżącą w ciągu co najmniej 10 minut. Wypłukane kawałki tkaniny układano pomiędzy ręcznikami i suszono w ciągu 12 godzin nie wyciskając. Własności piorące oceniono mierząc przy filtrze nr 1 remisję na aparacie Elrepho stosując jako wskaźnik tlenek magnezowy. Remisję obliczono jako procent remisji doskonale czystego kawałka tkaniny, tego samego gatunku. Otrzymane wyniki podano w tablicy I. Z uzyskanych wyników widać, że wartości remisji nie różnią się w sposób znaczny, a więc można wywnioskować, że własności piorące próbek zawierających kompozycję enzymatyczną są takie same, jak własności piorące próbek zawierających enzym przygotowany w sposób konwencjonalny.

Tablica I

j.D./g próbki	Próbka kompozycji enzymatycznej według wynalazku	Próbka enzymu otrzymanego w sposób konwencjonalny
0	45	45
250	58	59
500	66	66
1000	69	70
2000	75	73

Przykład II. Do stężonego przesączu hodowli bakteryjnej uzyskanego poprzez fermentację *Bacillus subtilis* o wartości pH = 7 i aktywności około 100000 j.D./ml dodaje się 10% objętościowych roztworu polimeru G-942 zawierającego 25% kopolimeru w wodzie, po czym wytrąca się niewielką ilość osadu. Następnie mieszaninę zakwasza się do wartości pH 4 dodając rozcieńczony roztwór kwasu siarkowego, co powoduje wytrącenie dużej ilości osadu stanowiącego kompozycję proteaza—polimer. Osad oddziela się w sposób analogiczny do opisanego w przykładzie I. Otrzymana kompozycja proteazy jest 2–4 razy czystsza niż preparaty konwencjonalne. Powyżej opisanym sposobem otrzymuje się kompozycję z wydajnością 90% w przeliczeniu na aktywność proteazy, w roztworze wyjściowym. Środek piorący zawierający kompozycję enzymatyczną ma podobne własności piorące, jak środek piorący zawierający porównywalne ilości tego samego enzymu otrzymanego w sposób konwencjonalny.

Przykład III. Przeprowadzono doświadczenie z równoważnymi polimerami dodając wodne roztwory badanych polimerów do roztworu proteazy zawierającego 80000–100000 j.D./ml i zakwaszając do wartości pH 4. Wytrącone osady odsącza się lub odwirowuje, przemycza i suszy w sposób analogiczny do opisanego powyżej. Uzyskane wyniki przedstawiono w tablicy II.

Tablica II

Polimer	Ciężar cząsteczkowy	Dawka % ¹⁾	Wydajność	Aktywność j.D./g
1	2	3	4	5
Kwas poliakrylowy		0,5	38	3520000
Kopolimer kwas akrylowy—styren, 2 : 1	21000	0,5	67	4740000
Kwas polimetakrylowy	50000	0,75	75	4560000
Kopolimer kwas metakrylowy—styren, 2 : 1	26000	1,25	66	4480000
Kopolimer kwas maleinowy—styren, 1 : 1	21000	0,5	83	4220000
Kopolimer kwas maleinowy—styren, 1 : 1	44000	0,25	83	4200000
Kopolimer kwas maleinowy—styren, 1 : 2	31000	0,5	79	3850000
Usieciowany kopolimer etylen—kwas maleinowy, 1 : 1	44000	0,16	57	4860000
Kopolimer etylen—kwas maleinowy, 1 : 1		0,15	55	4700000
Mieszanina kopolimerów 1 : 1, etylen—kwas maleinowy — 1 : 1 i kwas maleinowy—styren — 1 : 1		0,5	98	3320000
Kopolimer kwas maleinowy—styren — 1 : 1		0,5	95	4320000
Kopolimer monoestru butylowego i eteru metylowinyloвого — 1 : 1		0,6	30	3780000

1) % wagowy/objętość w przeliczeniu na suchą masę składników.

Przykład IV. Badano wpływ ilości roztworu polimeru G-942 na wydajność osadu. Do badań stosowano roztwór proteazy otrzymany z *Bacillus subtilis* o aktywności około 70000 j.D./ml. Wydajność osadu oznaczono rozpuszczając mokry osad i określając jego aktywność proteolityczną. Osad przemyczano i suszono w sposób już opisany i oznaczono zawartość polimeru w suchym osadzie. Uzyskane wyniki przedstawiono w tablicy III. Optymalną wydajność osadu otrzymano stosując dawkę 4–8% handlowego roztworu G-942.

Tablica III

Dawka % handlowego roztworu G-942	Wydajność osadu %	Zawartość polimeru G-942 w suchym preparacie %
0,25	31	10
0,5	63	
1	80	
2	85	18
4	89	25,5
8	89	
16	77	

Przykład V. Kompozycje Alcalase z kopolimerem kwas maleinowy—styren.

Do roztworu Alcalase stanowiącej enzym produkowany przez *Bacillus subtilis* dodaje się 5% obj. rozcieńczonego w stosunku 1 : 5 roztworu G-942. Następnie zakwasza się roztwór do wartości pH 4,2 dodając 4n roztwór kwasu octowego. Wytrącony osad odsącza się, przemywa acetonem i suszy, otrzymując bezwodną kompozycję Alcalase—kopolimer kwasu maleinowego i styrenu o aktywności 2420000 j.D./g z wydajnością 92%.

Przykład VI. Kompozycja proteazy z kopolimerem kwas maleinowy—styren.

Do 800 ml przesączu hodowli *Bacillus alkalophilus* zawierającego około 28000 j.D./ml dodaje się 16 ml rozcieńczonego w stosunku 1 : 5 polimeru G-942. Następnie roztwór zakwasza się do wartości pH 4,2 dodając 4n roztwór kwasu octowego. Wytrącony osad odwirowuje się, przemywa mieszaniną alkoholu metylowego i acetonu w stosunku 1 : 1 i suszy, otrzymując kompozycję proteaza—kopolimer kwasu maleinowego ze styrenem o aktywności 10900000 j.D./g z wydajnością 86%.

Przykład VII. Kompozycje amylazy z kopolimerem kwas maleinowy—styren.

Do 200 ml roztworu amylazy wyprodukowanej przez *Bacillus subtilis* dodaje się 20 ml rozcieńczonego w stosunku 1 : 5 roztworu G-942 i doprowadza się roztwór do wartości pH za pomocą 1n roztworu kwasu solnego. Wytrącony osad odwirowuje się i miesza z małą ilością wody. Mieszaninę doprowadza się do wartości pH 7 dodając 1n roztwór wodorotlenku sodowego i dolewa trzykrotną objętość acetonu. Po odsączeniu, przemyciu acetonem i wysuszeniu otrzymuje się kompozycję amylaza—kopolimer kwasu maleinowego ze styrenem z wydajnością 81%.

Przykład VIII. Kompozycję lipazy z kopolimerem kwas maleinowy—styren.

Do 20 ml roztworu zawierającego 600 mg preparatu lipazy (Lipase-My produkowanej przez Meito Sangyo Co., Ltd., Nagoya, Japonia z bulionu hodowli *Candida cylindracea* nov. sp.) o wartości pH 4,5 dodaje się 2 ml rozcieńczonego w stosunku 1 : 5 roztworu G-942. Następnie roztwór doprowadza się do wartości pH 3,5 dodając 1n roztwór kwasu solnego. Wytrącony osad odwirowuje się, przemywa acetonem i suszy, otrzymując 263 mg kompozycji lipaza—kopolimer kwasu maleinowego ze styrenem o aktywności równej 90% początkowej aktywności lipazy.

Przykład IX. Kompozycja laktazy z kopolimerem kwas maleinowy—styren.

Do 40 ml roztworu zawierającego 1% preparatu laktazy otrzymanej z drożdży i 0,5% żelatyny dodaje się 4,4 ml rozcieńczonego w stosunku 1 : 5 roztworu G-942 i kwasowość doprowadza się do wartości pH 4. Utworzony osad kompozycji laktoza—kopolimer kwasu maleinowego ze styrenem wykazuje 61% aktywności laktazy w stosunku do roztworu wyjściowego. W analogiczny sposób przeprowadza się ślepą próbę nie dodając G-942. Przy zakwaszeniu wytrąca się osad, ale o aktywności mniejszej niż 1% początkowej aktywności laktazy.

Przykład X. Kompozycja dehydrogenazy alkoholowej z kopolimerem kwas maleinowy—styren.

Do 120 ml przesączu zawierającego dehydrogenazę alkoholową, otrzymaną w wyniku autolizy drożdży piekarniczych o wartości pH 7 dodaje się 4% objętościowych rozcieńczonego w stosunku 1 : 5 roztworu G-942. Następnie doprowadza się wartość pH roztworu do wartości 4,5 dodając 4n roztwór kwasu octowego. Wytrącony osad odwirowuje się, przemywa alkoholem i suszy, otrzymując 3,3 g suchego kompleksu dehydrogenaza alkoholowa—kopolimer kwasu maleinowego ze styrenem o aktywności równej 55% początkowej aktywności przesączu drożdżowego.

Przykład XI. Własności toksyczne próbki enzymu otrzymanego w sposób konwencjonalny przez wytrącenie rozpuszczalnikami organicznymi oraz kompozycji enzym-polimer otrzymanej w sposób analogiczny do opisanego w przykładzie I bada się w sposób opisany poniżej. Próbkę standaryzuje się siarczanem sodowym tak, aby otrzymać aktywność proteolityczną równą około 300000 j.D./g, rozpuszcza się w wodzie i rozprowadza do komór za pomocą rozpylacza. W każdej komorze znajdowało się 5 mysz płci męskiej o wadze 24 g każda, otrzymanych z Carworth Burope, Alconbury, Huntingdon, Anglia. W pierwszym doświadczeniu stężenie enzymów w powietrzu wynosiło 5000 j.D./litr. Myszy poddawano działaniu enzymu w ciągu 5 godzin, a następnie obserwowano je w ciągu 7 dni. Pod wpływem działania produktu otrzymanego w sposób konwencjonalny padły dwie myszy, natomiast kompozycja enzym—polimer według wynalazku nie spowodowała śmierci żadnego zwierzęcia.

W drugim doświadczeniu 8 szczurów, w tym 4 samice i 4 samce, pochodzących z tego samego źródła poddano działaniu enzymów o aktywności 800 j.D./litr w ciągu 68 godzin. Po trzech dniach obserwacji stwierdzono, że pod wpływem działania enzymu otrzymanego w sposób konwencjonalny padło 6 szczurów, natomiast kompozycja enzym—kopolimer nie spowodowała śmierci żadnego zwierzęcia.

W trzecim doświadczeniu 8 szczurów poddano działaniu enzymów o aktywności 800 j.D./litr w ciągu 5 kolejnych dni po pięć godzin dziennie. Po 14 dniach obserwacji stwierdzono, że pod wpływem działania enzymu otrzymanego w sposób konwencjonalny padł 1 szczur, natomiast kompozycja enzym—polimer według wynalazku nie spowodowała śmierci żadnego szczura.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania enzymatycznej kompozycji, z n a m i e n n y t y m, że wodny roztwór enzymu kontaktuje się z rozpuszczonym polimerem rozpuszczalnym w wodnym roztworze ługu i posiadającym prosty lub rozgałęziony łańcuch węglowy z grupami karboksylowymi odpowiednio rozmieszczonymi wzdłuż tego łańcucha, oraz ewentualnie zawierający jako kolejne podstawniki podstawione ewentualnie grupy węglowodorowe i jego łańcuch węglowy i/lub podstawniki węglowodorowe ewentualnie zawierają heteroatomy, a zwłaszcza atomy tlenu pomiędzy atomami węgla, a średni ciężar cząsteczkowy tego polimeru wynosi co najmniej 10000, następnie pH mieszaniny ustala się pomiędzy około 2–9 w taki sposób aby wytrącił się osad, który oddziela się.

2. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się wodny roztwór enzymu pochodzący z przesączonego bulionu lub ekstraktu komórkowego.

3. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że ustala się pH mieszaniny pomiędzy około 2–6.

4. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się polimer zawierający grupy $-\text{CHXCY}(\text{COOH})-$, w których X oznacza atom wodoru lub grupę karboksylową, Y oznacza atom wodoru lub grupę metylową oraz polimer ten ewentualnie kopolimeryzuje się z jednym lub więcej innymi monomerami lub ich częściowymi niższymi estrami lub amidami alkilowymi.

5. Sposób według zastrz. 4, z n a m i e n n y t y m, że jako polimer stosuje się polimer kwasu akrylowego lub metakrylowego z grupami karboksylowymi lub kopolimer kwasu akrylowego, metakrylowego lub maleinowego z grupami karboksylowymi z takimi konomerami jak styren, etylen lub eter metylowinylowy.

6. Sposób według zastrz. 5, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się polimer składający się z merów kwasu maleinowego i styrenu.

7. Sposób według zastrz. 6, z n a m i e n n y t y m, że utrzymuje się cząsteczkowy stosunek merów kwasu maleinowego i styrenu od około 3 : 1 do 1 : 3.

8. Sposób według zastrz. 7, z n a m i e n n y t y m, że utrzymuje się cząsteczkowy stosunek merów kwasu maleinowego i styrenu od około 3 : 2 do 2 : 3.

9. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się polimer o średnim ciężarze cząsteczkowym powyżej 20000.

10. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że jako enzym stosuje się proteazę, którą ewentualnie miesza się z innym enzymem, takim jak amylaza i/lub lipaza.

11. Sposób według zastrz. 10, z n a m i e n n y t y m, że stosuje się proteazę wytwarzaną przez gatunki *Bacillus*.

12. Sposób według zastrz. 1, z n a m i e n n y t y m, że enzymatyczną kompozycję odsącza się, przemysła i suszy.

13. Sposób według zastrz. 12, z n a m i e n n y t y m, że enzymatyczną kompozycję przemysła się rozpuszczalnikiem organicznym, takim jak aceton lub alkohol etylowy.