



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

209755

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 11/12

/22/ Přihlášeno 25 04 80
/21/ /PV 2921-80/

(40) Zveřejněno 31 03 81

(45) Vydáno 15 02 83

(75)

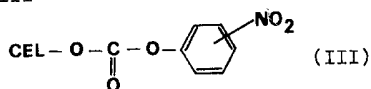
Autor vynálezu

ŠVEC FRANTIŠEK ing. CSc., HŘEBEČ, KUDLVASOVÁ HELENA ing.,
KONEČNÁ IVANA ing., PRAHA /ČSSR/, MENJAJLOVA IRINA IVANOVNA ing. CSc.
a NACHAPETJAN LEVON ARUTJUNOVIČ ing. CSc., MOSKVA /SSSR/

(54) Způsob immobilizace amyloglukosidázy na celulosový nosič

Vynález se týká způsobu immobilizace amyloglukosidázy na celulosový nosič. Tento způsob umožňuje získat ve vodě nerozpustný konjugát enzymu a celulosy držený pospolu kovalentní vazbou. Tato forma umožňuje jeho opakované použití.

Způsob podle vynálezu se provádí tak, že se aktivovaný nosič obsahující skupiny vzorce III

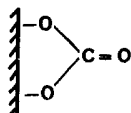


kde CEL je opakující se jednotka celulosového řetězce, smísí s roztokem enzymu amyloglukosidázy v pufru o pH 3,5 až 7 a při teplotě 4 až 37 °C ponechá reagovat po dobu 0,25 až 6 hodin, načež se pevná fáze oddělí.

Po oddělení se pevná fáze s výhodou promyje vodou a/nebo 1 až 40% roztokem škrobu a/nebo 0,5% roztokem detergentu vybraného ze skupiny zahrnující alkylfenylpolyethylenoxidethery obsahující 1 až 12 atomů uhlíku v alkylu, a nakonec roztokem pufru o pH 4,7.

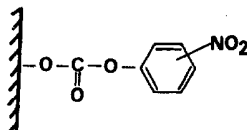
Vynález se týká způsobu immobilizace amyloglukosidázy na celulosový nosič. Tento způsob umožňuje získat ve vodě nerozpustný konjugát enzymu a celulosy držený pospolu kovalentní vazbou. Tato forma umožňuje jeho opakované použití, což přináší značné ekonomické přednosti jednak v úspoře enzymu, jež se může několikrát recyklovat ve výrobním procesu, jednak ve stabilizaci proti denaturaci, např. teplem či jinými vlivy.

Immobilizace amyloglukosidázy na celulosový nosič je známa. Přitom byly využity prakticky všechny doposud známé techniky, tj. enkapsulace, zachycení v gelové matici, fyzikální i kovalentní vazba k nosiči. Tak např. DOS 2 146 390 popisuje vlákna na bázi triacetátu celulosy naplněná amyloglukosidázou; obdobně také DOS 2 303 872 a US patent 3 809 605. Jiná skupina patentů popisuje použití celulosy jako plniva při zesíťování enzymu bifunkčním činidlem (DOS 2 345 186, DOS 2 345 185) nebo při radiační polymerizaci monomeru v přítomnosti enzymu (DOS 2 633 259). Velká pozornost byla věnována immobilizaci prostřednictvím iontových vazeb zejména na DEAE derivátu celulosy (DOS 2 538 322, US patent 4 102 745, Jap. přihláška vynálezu 7 844 685, Brit. patent 1 302 706, US patent 4 029 546). Immobilizací prostřednictvím kovalentní vazby při použití aminoethylcelulosy a glutaraldehydu se zabývá SSSR autorské osvědčení 507 636, diazotované nosiče na celulosové bázi jsou popsány v DOS 2 336 423 a 2 012 089. DOS č. 2 062 246 je koncentrován na enzymatické preparáty a způsob jejich výroby immobilizací na karbonát celulosy kromě dalších způsobů. Celulosa se nejprve modifikuje ve směsném rozpouštědle dimethylsulfoxid-1,4-dioxanethylesterem kyseliny chloromravenčí v přítomnosti triethylaminu, pak neutralizuje a rozmíchá se v 90% ethanolu. Nosič pak obsahuje skupiny typu I.



(I)

Jiný způsob výhodné aktivace celulosy spočívá v reakci s nitrofenylesterem kyseliny chloromravenčí v 1,4-dioxanu dávající skupiny typu II podle čs. autorského osvědčení č. 204 190

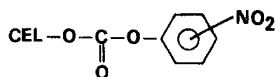


(II)

Derivát celulosy I byl pak použit pro immobilizaci různých enzymů včetně amyloglukosidázy. Ani po třech hodinách reakce nebylo množství navázaného enzymu použitelně vysoké a rozdíl mezi slepým pokusem (1,9 μ mol glukosy/g nosiče za 1 hodinu) s neaktivovanou celulosou a při použití derivátu typu I (1,8 μ mol/g.h) není výrazný. Přitom byl použit relativně čistý preparát z *Aspergillus niger* s aktivitou 27 U/mg bílkoviny.

Tento velmi závažný nedostatek je odstraněn při immobilizaci způsobem podle tohoto vynálezu. Zde se s výhodou využívá aktivního derivátu celulosy typu II, který je relativně snadno přístupný, stabilní, ale též dostatečně reaktivní. Další výhodou způsobu immobilizace podle vynálezu je skutečnost, že po skončení immobilizační reakce lze snadno kontrolovat odstranění zbylých nezreagovaných skupin typu II, které by v opačném případě mohly způsobovat závažné problémy při aplikaci produktu. Detekce při jejich likvidaci vznikajícího nitrofenolu žluté barvy je velmi jednoduchá prostřednictvím fotometru.

Předmětem vynálezu je způsob immobilizace amyloglukosidázy na celulosový nosič, který spočívá v tom, že se aktivovaný nosič obsahující skupiny vzorce III



(III)

kde CEL je celulosová opakující se jednotka celulosového řetězce, smísí s roztokem enzymu amyloglukosidázy v pufru o pH 3,5 až 7 a při teplotě 4 až 37 °C ponechá reagovat po dobu 0,25 až 6 hodin, pevná fáze se oddělí s výhodou filtrací nebo odstředěním. Potom se výhodně promyje vodou, a/nebo 1 až 40% roztokem škrobu a/nebo 0,5% hmot. roztokem detergentu vybraného ze skupiny zahrnující alkylfenylpolyethylenoxidethery s 1 až 12 atomy uhlíku v alkylu, a nakonec s výhodou roztokem pufru o pH = 4,7.

Získaný preparát se používá při výrobě glukosy ze škrobu, přičemž lze výrobu výrazně zefektivnit. Podobný postup lze realizovat i pro jiné enzymy, neboť je do jisté míry obecný. Vynález je dále blíže objasněn na příkladech provedení.

P ř í k l a d 1

Aktivovaná celulóza, uchovávaná v 1,4-dioxanu, byla promyta pufrům pH 4,0 a odstředěna. K navážce 0,2 g byly přidány 2 ml 0,5 M acetátového pufru pH = 4 a 2 ml roztoku amyloglukosidázy z *Aspergillus niger* o celkové aktivitě 190 jednotek (počet jednotek reprezentuje počet μ mol glukosy vzniklých rozštěpením škrobu za 1 minutu při použití daného množství preparátu) a směs 1 hodinu míchána při 25 °C. Imobilizovaný enzym byl poté promyt 100 ml vody, 30 ml 35% roztoku škrobu a poté 100 ml 0,1 M acetátového pufru pH = 4,7. Získaný vzorek měl aktivitu 570 jednotek/g suchého preparátu.

P ř í k l a d 2

Stejným způsobem jako v příkladu 1 byla provedena imobilizace s tím rozdílem, že byl použit 1 M acetátový pufr pH = 3,5 při imobilizační reakci. Po jejím skončení byl produkt promyt 100 ml vody, 50 ml 10% roztoku škrobu a 100 ml acetátového pufru pH = 4,7. Aktivita byla 230 jednotek/g suchého preparátu.

P ř í k l a d 3

Stejným způsobem jako v příkladě 1 kromě pufru, jenž měl zde pH = 7, byl získán preparát s aktivitou 160 jednotek/g suchého vzorku.

P ř í k l a d 4

Celý proces byl proveden shodně jako v případě příkladu 1 pouze doba styku nosiče s enzymem byla zkrácena na 15 minut při teplotě 37 °C. Produkt měl pak aktivitu 370 jednotek/g suchého preparátu.

P ř í k l a d 5

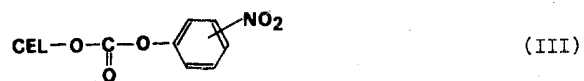
Stejným způsobem jako v příkladu 1 byla provedena imobilizace, avšak doba vlastní reakce byla prodloužena na 4 hodiny při teplotě 4 °C. Aktivita byla 310 jednotek/g suchého preparátu.

P ř í k l a d 6

Produkt imobilizace získaný postupem podle příkladu 1 byl namísto roztokem škrobu promýván 0,5% roztokem n-oktylfenyl-dekaetylenoxidetheru. Aktivita byla 590 jednotek/g suchého preparátu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob immobilizace amyloglukosidázy na celulosový nosič, vyznačený tím, že se aktivovaný nosič obsahující skupiny vzorce III



kde CEL je opakující se jednotka celulosového řetězce, smísí s roztokem enzymu amyloglukosidázy v pufru o pH 3,5 až 7 a při teplotě 4 až 37 °C ponechá reagovat po dobu 0,25 až 6 hodin, načež se pevná fáze oddělí.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se pevná fáze po oddělení promyje vodou a/nebo 1 až 40% roztokem škrobu a/nebo 0,5% roztokem detergentu vybraného ze skupiny zahrnující alkylfenylpolyethylenoxidethery obsahující 1 až 12 atomů uhlíku v alkyly, a nakonec roztokem pufru o pH 4,7.