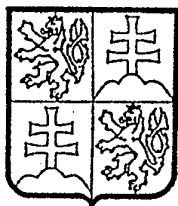


ČESKÁ A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

PATENTOVÝ SPIS 275 662

(21) Číslo přihlášky : 6642-89.P

(22) Přihlášeno : 24 11 89

(30) Prioritní data :

(13) Druh dokumentu : B6

(51) Int. Cl.⁵ :

C 12 N 11/04

(40) Zveřejněno : 11 06 91

(47) Uděleno : 20 12 91

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18 03 92

(73) Majitel patentu : SLOVENSKÁ TECHNICKÁ UNIVERZITA V BRATISLAVĚ,
BRATISLAVA

(72) Původce vynálezu : KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA,
MATUSOVÁ ANGELA ing., ZLATÉ KLASY

(54) Název vynálezu : Nosič na stabilizáciu enzýmov a spôsob jeho
prípravy

(57) Anotace :

Riešenie sa týka nosiča na stabilizáciu enzýmov na báze proteínov. Jeho podstatou je, že je tvorený práškovou formou proteínu, s výhodou vaječného bielka, alebo hovädzieho albumínu, alebo kazeínu, zosieteného epichlórhydrínom v množstve 15 až 25 % hmot. na hmotnosť sušiny proteínu, pričom veľkosť častíc nosiča je v rozsahu 40 až 300 mikrometrov a hodnota napúčania vo vode je v rozsahu 6 až 15 ml/g. Podstata spôsobu prípravy spočíva v tom, že roztok proteínu, s výhodou vaječného albumínu sa zosieťuje epichlórhydrínom v alkalickom prostredí pri teplote 15 až 30 °C po dobu 12 až 20 hodín. Potom sa zosietený proteín za mokra defibruje na častice o veľkosti 40 až 300 mikrometrov a po premytí sa z nich voda vytesní etanolom, ktorý sa z gélu voľne odparí. Na vysušený nosič sa nanesie enzýmový roztok hydrolázy v pomere 0,75 ml enzýmového roztoku na 1 g suchého nosiča a nechá sa voľne vysušiť. Takto zakotvený enzým má vysokú stabilitu pri dlhodobom skladovaní. Riešenie má použitie všade, kde je potrebné dlhodobu stabilizovať hlavne hydrolázové enzýmy pri dlhodobom skladovaní bez straty enzýmovej aktivity.

Vynález sa týka nosiča na stabilizáciu enzýmov a spôsobu jeho prípravy.

Stabilizácia enzýmov je dôležitá tak pre účely základného výskumu, ako i pre potreby spoločenskej praxe. Mnohé enzýmy najmä pri vysokých stupňoch čistoty sú veľmi citlivé na stratu aktivity pri skladovaní, a to nielen pri laboratórnych teplotách, ale i pri znížených teplotách, čím sa znehodnocuje práca spojená s ich izoláciou a purifikáciou. Sú známe rôzne spôsoby stabilizácie enzýmov tak v roztoku, alebo v pevnom stave ich chemickou modifikáciou /R.Axén, P.Marin, Jonson J.: Biopolymers 9,401 /1970/, resp. immobilizáciou/ K. Mosbach: Meth. Enzymol. 44,453 /1976/. Spoločným nedostatkom známych postupov stabilizácie enzýmov je spravidla ich technologická náročnosť, ako i strata značnej časti aktivity enzýmu v modifikačnom stupni.

Uvedené nedostatky rieši nosič na stabilizáciu enzýmov na báze proteínov podľa vynálezu, ktorého podstatou je, že je tvorený práškovou formou proteínu, s výhodou vaječného bielka alebo hovädzieho albumínu alebo kazeínu, zosieteného epichlórhydrínom v množstve 15 až 25 % hmot. na hmotnosť sušiny proteínu, pričom veľkosť častíc nosiča je v rozsahu 40 až 300 mikrometrov a hodnota napúčania vo vode je v rozsahu 6 až 15 ml/g. Podstatou spôsobu prípravy nosiča je, že vodný roztok proteínu o koncentrácii 10 až 13 % hmot., s výhodou čerstvý vaječný bielok, sa sieťuje v prostredí hydroxidu sodného o koncentrácii 0,8 až 1,2 % hmot. pri teplote 15 až 25 °C po dobu 12 až 20 h s epichlórhydrínom v množstve 1,5 až 2,5 % hmot. na hmotnosť sieťovaného proteínového roztoku, načo sa zosietený proteín zmixuje v rýchloobrátkovom mixeri v etanole na veľkosť častíc 40 až 300 mikrometrov, suspenzia sa premyje na filtrí destilovanou vodou do neutrálnej reakcie a nakoniec sa voda z gélu vytlesní alkoholom a alkohol sa odparí voľne na vzduch alebo vo vákuovej sušiarňi pri teplote do 40 °C.

Pri využití nosiča podľa vynálezu nedochádza k poklesu aktivity enzýmu a spôsob prípravy nosiča je technologicky podstatne jednoduchší v porovnaní s doteraz známymi postupmi.

Výsledný produkt, biely prášok s veľkosťou častíc 40 až 300 mikrometrov je vhodný ako pevný nosič na stabilizáciu najmä hydrolázových enzýmov. Stabilizácia enzýmu na pripravenom nosiči sa robí jednoducho tak, že enzýmový roztok nalejeme na suchý nosič najlepšie v pomere 0,75 ml roztoku enzýmu na 1 g suchého nosiča, dobre rozmiešame necháme 5 až 10 minút nasať kvapalnú fázu do pórov nosiča a potom zvlhčený nosič necháme voľne na vzduchu vysušiť v tenkej vrstve. Vysušený nosič s enzýmom sa môže skladovať pri laboratórnej teplote, resp. u citlivejších enzýmov pri teplote 4 až 8 °C dlhú dobu bez zjavnej straty enzýmovej aktivity. Enzým podľa potreby uvoľníme z nosiča miešaním v 20 až 50 násobku destilovanej vody pri izbovej teplote po dobu 15 minút. Zosietený gél sa odcentrifuguje alebo odfiltruje. Supernatant, resp. filtrát s rozpusteným enzýmom o pôvodnej aktivite použijeme podľa potreby.

Pochopiteľne roztok enzýmu pred stabilizáciou s ohľadom na pH a ionovú silu upravíme na optimálne hodnoty konkrétného enzýmu. Pri navrhovanom spôsobe stabilizácie enzýmov na pevnej bielkovinovej matrici nedochádza ku kovalentnej väzbe enzýmu na pevný nosič, ale jedná sa tu o fyzikálnu adsorpciu enzýmu na pevný nosič, ktorý má protektorové vlastnosti proti molekule enzýmu, ktorá sa pri vysušovaní orientuje na povrch proteínu tak, že aktívne centrá uchovávaného enzýmu sú chránené proti fyzikálno-chemickej dezaktivácii.

Na prípravu navrhovaného nosiča možno použiť aj iný typ proteínu, napr. hovädzí albumín, kazeín a.i., no ekonomicky je najvýhodnejší vaječný bielok.

Hlavnou výhodou navrhovaného spôsobu prípravy nosiča na stabilizáciu enzýmov je jeho všeobecná dostupnosť, jednoduchosť prípravy a vysoká účinnosť stabilizácie hydrolázových enzýmov.

Príklad 1

K 100 g vaječného bielka so sušinou 12,6 % sa pridá 1,5 ml epichlórhydrínu a mieša sa pri laboratórnej teplote 30 min., kedy je epichlórhydrín homogénne rozpustený v celom objeme bielka. Potom sa pridá za zrýchleného miešania 1,5 ml 17,5 % hydroxid sodný a nechá sa

pri laboratórnej teplote sieťovať 20 hodín. Po zosietení sa pevný gél mixuje v mixeri pri otáčkách 1500/min v 200 ml etanolu po dobu 2 minút. Zmixovaný gél sa potom odfiltruje cez sklený filter a na filteri sa premýva destilovanou vodou do neutrálnej reakcie filtrátu. Voda sa z gélu vytesní etanolom a etanol sa odparí na vzduchu z tenkej vrstvy gélu na filtračnom papieri, alebo sa odparí vo vákuovej sušiarňi pri teplote do 40 °C. Vysušený gél sa presituje cez sitá 0,04 a 0,3 mm. Hrubšie častice, ktoré ostanú na site 0,3 mm, sa zomelú za sucha tak, až celý podiel častíc prejde cez sito 0,3 mm. Frakcia, ktorá prejde sitom 0,04 sa pre účely stabilizácie enzýmov nepoužije, ale len frakcia v rozsahu 0,04 až 0,03 mm. Výťažok použiteľnej frakcie sa pohybuje v rozsahu 90 až 95 % hmot. na hmotnosť sušiny použitého proteínu. Stabilizácia enzýmu: Na 10 g pripraveného suchého proteínového nosiča sa naleje naraz 7,5 ml roztoku α -amylázy pankreatickej o aktivite 6,0 μ kat vo fosfátovom pufri 0,05 M o pH 7,0 a dobre sa zamieša, aby sa kvapalná fáza rovnomerne rozdelila na pevnom nosiči. Po 15 min možno vzorku v tenkej vrstve na celofáne nechať vysušiť cez noc pri izbovej teplote. Po vysušení sa vzorka homogenizuje v tretej miske a uskladní pri izbovej teplote. Po polročnom skladovaní aktivita enzýmu poklesla len o 4,5 %.

Ak sa rovnaký roztok enzýmu naniesol na rovnaké množstvo suchej mikrokryštalickej celulózy a nechal sa rovnako vysušiť, tak sa regenerovalo ihneď po vysušení už len 2 % pôvodnej aktivity, tj. mikrokryštalická celulóza nemá žiadne protektorové vlastnosti pre uchovávanie enzýmovej aktivity pri skladovaní enzýmov.

Príklad 2

Postup ako v príklade 1 s tým rozdielom, že na sieťovanie sa použije 2,5 ml epichlórhydrínu a sieťovanie trvá 12 hodín pri laboratórnej teplote. Výsledný produkt má obdobné vlastnosti ako produkt v príklade 1.

Príklad 3

Postup ako v príklade 1 s tým rozdielom, že ako proteín sa použije hovädzí albumín rozpustný v destilovanej vode na koncentráciu 12,0 % hmot. Výsledný produkt má porovnateľné vlastnosti ako produkt z príkladu 1.

Príklad 4

Postup ako v príklade 1 s tým rozdielom, že ako enzým na štabilizáciu sa použije slinná alfa-amyláza. Stabilita enzýmu je obdobná po pol roku ako v príklade pankreatickej alfa amylázy.

Vynález má použitie všade, kde je potrebné skladovať hydrolázové enzýmy bez straty aktivity, napr. pri príprave enzýmových štandardov slinnej a pankreatickej alfa amylázy pri diagnostikovaní funkčných porúch pankreasu v humánnej medicíne.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Nosič na stabilizáciu enzýmov na báze proteínov, vyznačujúci sa tým, že je tvorený práškovou formou proteínu, s výhodou vaječného bielka alebo hovädzieho albumínu alebo kazeínu, zosieteného epichlórhydrínom v množstve 15 až 25 % hmot. na hmotnosť sušiny proteínu, pričom veľkosť častíc nosiča je v rozsahu 40 až 300 mikrometrov a hodnota napúčania vo vode je v rozsahu 6 až 15 ml/g.

2. Spôsob prípravy nosiča na stabilizáciu enzýmov podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že vodný roztok proteínu o koncentrácii 10 až 13 % hmot., s výhodou čerstvý vaječný bielok, sa sieťuje v prostredí hydroxidu sodného o koncentrácii 0,8 až 1,2 % hmot. pri teplote 15 až

30 °C po dobu 12 až 20 h s epichlórhydrínom v množstve 1,5 až 2,5 % hmot. na hmotnosť sieťovaného proteinového roztoku, načo sa zosietený proteín zmixuje v etanole na veľkosť častíc 40 až 300 mikrometrov suspenzia sa premyje na filtri destilovanou vodou do neutrálnej reakcie, voda sa z gélu vytesní alkoholom a alkohol sa odparí pri teplote do 40 °C.