



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

205 718

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlášené 15 02 79
(21) PV 1028-79

(51) Int. Cl.³ C 08 B 15/10

(40) Zverejnené 29 08 80
(45) Vydané 01 09 83

(75)

Autor vynálezu GEMEINER PETER ing. CSc. a KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy para-aminobenzylcelulózy

1

Vynález sa týka spôsobu prípravy p-aminobenzylcelulózy vhodnej pre imobilizáciu enzýmov a pre afinitnú chromatografiu enzýmov.

Polysacharidy, obsahujúce primárne aromatické aminoskupiny, sú už dlhší čas vyhľadávanými materiálmi (nosičmi) vo všetkých oblastiach enzýmového inžinierstva. Pritom sa s úspechom používajú polysacharidy na báze agarózy (napr. Sepharose) či dextránu (napr. Sephadex), ktoré dodávajú zahraničné firmy. Postupy vypracované pre prípravu primárnych aromatických aminoderivátov uvedených polysacharidov, využívajúce aktiváciu polysacharidov brómkyánom či reakciu s 2-hydroxy-3-(p-nitrofenoxi) propyléterom nedávajú u celulózy uspokojivé výsledky (R. Axén, S. Ernback, Eur. J. Biochem. 18/1971/351; S. A. Barker, P. J. Somers, R. Epton, Carbohydr. Res. 8/1968/491). Na druhej strane postupy už dávnejšie vypracované pre prípravu p-aminobenzylcelulózy (PAB) za použitia p-nitrobenzylchloridu (PNBC) pre éterifikáciu celulózy v 1. stupni sú už pre dnešné požiadavky nevyhovujúce. Používajú sa pri nich totiž značne extrémne podmienky (3 hodinová reakcia v 40 % NaOH pri 95 °C), pričom produkt neobsahuje viac než 0,3 % dusíka (napr. D. H. Campbell, E. Luescher, L. S. Lerman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 37/1951/575). Tomu zodpovedá i v súčasnosti jediná komerčne dostupná PAB celulóza-Servacel PAB 23, dodávaná firmou Serva Feinbiochemica, Heidelberg, NSR v cene 18,90 DM za 10 g.

Naše výsledky výskumu v tejto oblasti ukázali, že použitie sieťovanej práškovej, mikrokryštalickej či vláknitej celulózy ako východiskového materiálu pre éterifikáciu s PNBC

205 718

umožňuje zásadne zmierniť reakčné podmienky pri podstatne vyšších stupňoch substitúcie.

Také vysoké stupne substitúcie nie je možné dosiahnuť ani pri použití rôznych druhov nesieťovaných celulóзов v rozmedzí priemerných polymeračných stupňov PPS od 150 do 1350 pri inak optimálnych podmienkach. Vzhľadom ku charakteru použitých sieťovaných celulóзов je potrebné viesť redukciu PNB celulóзы ditioničitanom sodným vo vodných roztokoch NaOH.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že celulóза sa v prvom stupni aktivuje s 20 až 25 % hydroxidom sodným pri izbovej teplote a sieťuje s 15 až 75 % epichlórhydrínu na váhu celulóзы pri teplote 20 až 50 °C, po dobu 1 až 3 hod., pri hydromodule 10, na čo sa v druhom stupni nechá zosietená celulóза reagovať s PNEC v 1,075 až 3,2 násobnom váhovom množstve na suchú váhu celulóзы v 11 až 12 % NaOH, pri hydromodule 10, pri teplote 45 až 75 °C, po dobu 3 hodiny, za stáleho miešania, načo sa reakčná zmes vyleje do 25 násobného objemu vody, premyje sa na filtri vodou, 50 % etanolom a acetónom do bezfarebnej reakcie filtrátu, aby sa potom extrahovala v Soxhletovej extrakčnej aparatúre acetónom 4 až 6 dní do bezfarebnej reakcie acetónu, a v treťom stupni sa nechá vysušená PNB celulóза reagovať s ditioničitanom sodným, 4-násobným mólovým prebytkom vzhľadom k obsahu dusíka v PNB celulóze, v 1,45 M NaOH, po dobu 1 hod. pri teplote 65 °C, za stáleho miešania, načo sa ochladí a premyje na filtri vodou, 0,1 M HCl, vodou, 50 % etanolom, acetónom do bezfarebnej reakcie filtrátu a nechá sa vysušiť pri 40 °C.

Najvýhodnejšia z celulóзов je prášková, u ktorej sa dosahuje najvyšší stupeň substitúcie. Z nej pripravená PAB celulóза má dobré hydrodynamické vlastnosti pre prácu s kolónami, ako aj pre "batch" usporiadania.

Sieťovanie s epichlórhydrínom je volené tak, aby napúšťací objem zosietovanej celulóзы sa pohyboval v medziach 3,4-5,5 ml/g, čo je zárukou vysokého stupňa konverzie pri miernych reakčných podmienkach. Pri vyšších stupňoch zosietovania, ako aj pri vyšších napúšťacích objemoch zosietovanej celulóзы klesá stupeň substitúcie. Optimálna doba sieťovania je za reakčných podmienok predmetu vynálezu 1 hodina pri teplote 20 °C a potom 45 minút pri teplote 50 °C. Zosietená celulóза sa nechá aktivovať v 25 % NaOH, 1 hodinu, pri teplote 4 °C, k suspenzii sa pridá PNEC a voda, aby sa dosiahla 11 až 12 % koncentrácia NaOH a potom sa začne zvyšovať teplota. Reakčnú zmes je potrebné dôkladne miešať, pretože PNEC je slabo rozpustný vo vode.

Po ukončení reakcie sa premývaním veľkým množstvom vody so slabo alkalickou reakciou odstráni p-nitrobenzylalkohol ako vedľajší produkt reakcie. Premývanie PNB celulóзы je najpomalší technologický stupeň prípravy, nakoľko voľný nezreagovaný PNEC sa musí kvantitatívne z medziproduktu vymyť až je filtrát úplne čirý. Premývanie medziproduktu je nutné ukončiť extrakciou horúcim acetónom, pretože za laboratórnej teploty nie je možné dosiahnuť uspokojivé premytie. Premývanie konečného produktu už nie je natoľko náročné na čas.

PAB celulóза s obsahom dusíka 0,15 až 1,85 % je vhodným nosičom pre imobilizáciu enzýmov tradičnými postupmi využívajúcimi diazotačné a kopulačné reakcie primárnych aromatických aminoskupín ako aj tvorbu izotiockyanátov po ich reakcii s tiofosgénom. Po premene na izotiockyanátové deriváty môže byť PAB celulóза vhodným materiálom na izoláciu tiolov (P. Gemeiner, J. Augustín, L. Drobnica, Carbohydr. Res. 53/1977/217) ako aj na izoláciu

a purifikáciu tiolových enzýmov (P. Gemeiner, Ľ. Drobica, K. Poláková, Journal of Solid-Phase Biochemistry 3/1978/289).

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy PAB celulózy je, že:

- umožňuje prípravu PAB celulózy v miernych reakčných podmienkach, ktoré nekladú také nároky na prevádzkovú prax,
- zmiernuje reakčné podmienky pri 1. stupni reakcie z hľadiska zníženia teploty z 95 ° na 45 °C a koncentrácie použitého NaOH zo 40 % na 11,5 %, čo môže znamenať významný ekonomický faktor,
- taký vysoký obsah dusíka nemožno dosiahnuť pri optimálnych podmienkach ani u nesieťovaných celulóz s priemerným polymeračným stupňom v rozmedzí od 150 do 1350,
- prípravu PAB celulózy je možné v miernych reakčných podmienkach viesť tak, aby pri získaní produktu s vyhovujúcimi vlastnosťami sa dosiahla úspora PNBC,
- stupeň substitúcie PAB celulózy je možné regulovať stupňom zosieťovania celulózy pri zachovaní miernych reakčných podmienok,
- navrhovaný postup umožňuje prípravu PAB derivátov polysacharidov dostupných z domácich zdrojov.

Príklad 1

20 g práškovej celulózy sa mieša v roztoku 100 ml acetónu, 80 ml vody, 16,25 ml 25 % NaOH pri laboratórnej teplote. Potom sa roztok odfiltruje cez sklený filter a dobre odsatá celulóza sa nechá na vzduchu tak dlho, pokiaľ sa neodparí acetón. Acetónu zbavená celulóza sa dá do reakčnej baňky, pridá sa 9,5 ml epichlórhydrínu a mieša sa 1 hodinu pri teplote 20 °C. Potom sa teplota zvýši na 50 °C a nechá sa pri tejto teplote 45 min. Celulóza sa potom premyje a vysuší organickým rozpúšťadlom. K 20 g takejto celulózy sa pridá 92 ml 25 % NaOH a suspenzia sa mieša 1 hodinu pri teplote 4 °C. Pridá sa 64 g PNBC a 108 ml vody. Reakčná zmes za stáleho miešania sa zahreje na 60 °C a takto udržiava 3 hodiny. Po skončení sa vyleje reakčná zmes do 5 l vody a po dôkladnom premiešaní sa prefiltruje cez sklený filter, na ktorom sa ďalej premýva vodou a 50 % etanolom dovtedy, až filtrát nie je iba slabožltá sfarbený a nakoniec acetónom pokiaľ nie je filtrát bezfarebný. Premývací postup vodou, 50 % etanolom a acetónom sa znovu zopakuje, tentokrát po každom premývaní musí byť filtrát bezfarebný. Surový produkt sa odsaje, preniesie do extrakčnej patróny a extrahuje v Soxhletovej aparátúre (1000 ml) asi 500 ml acetónu dovtedy, kým acetón skondenzovaný nad patrónou nie je bezfarebný. Acetón sa dôkladne odsaje a produkt vysuší na vzduchu alebo v sušiarňi pri 40 °C. 20 g PNB celulózy sa nechá napučať v 100 ml vody a 40 ml 5 M NaOH, pridá sa 17 g ditioničitanu sodného a suspenzia sa za stáleho miešania zahreje na 65 °C a takto udržiava 1 hodinu. Po ochladení sa produkt premýva vodou, 0,1 M HCl a znovu vodou, dokiaľ filtrát nie je iba slabožltá sfarbený. V premývaní sa pokračuje 50 % etanolom a nakoniec acetónom dovtedy, kým filtrát nie je bezfarebný. Premytie vodou, 0,1 M HCl, vodou, 50 % etanolom a acetónom sa zopakuje, tentokrát po každom premytí musí byť filtrát bezfarebný. Acetón sa dôkladne odsaje a produkt sa vysuší na vzduchu alebo v sušiarňi pri 40 °C. Suchý produkt vykazuje 1,22 % dusíka.

205 718

Príklad 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že teplotu reakcie sieťovanej celulózy s PNBC znížime na 45 °C, pri redukcii PNB celulózy pridáme 11,9 g ditioničitanu sodného a ďalej pokračujeme ako v príklade 1.

Suchý produkt má 0,36 % dusíka.

Príklad 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že teplotu reakcie sieťovanej celulózy s PNBC zvýšime na 75 °C, pri redukcii PNB celulózy pridáme 24,0 g ditioničitanu sodného a ďalej pokračujeme ako v príklade 1.

Suchý produkt má 1,84 % dusíka.

Príklad 4

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že množstvo PNBC znížime na 21,5 g, pri redukcii PNB celulózy pridáme 7,9 g ditioničitanu sodného, a ďalej pokračujeme ako v príklade 1.

Suchý produkt má 0,475 % dusíka.

Príklad 5

Postup podľa príkladu 4 s tým rozdielom, že pri sieťovaní celulózy pridáme 2,4 ml epichlórhydrínu, pri redukcii PNB celulózy 1,5 g ditioničitanu sodného, a ďalej pokračujeme ako v príklade 4.

Suchý produkt má 0,15 % dusíka.

Príklad 6

Postup podľa príkladu 4 s tým rozdielom, že pri sieťovaní celulózy pridáme 4,75 ml epichlórhydrínu, pri redukcii PNB celulózy 6,75 g ditioničitanu sodného, a ďalej pokračujeme ako v príklade 4.

Suchý produkt má 0,21 % dusíka.

Príklad 7

Postup podľa príkladu 4 s tým rozdielom, že pri sieťovaní celulózy použijeme 24,4 ml 25 % NaOH, pridáme 13 ml epichlórhydrínu, pri redukcii PNB celulózy 6,85 g ditioničitanu sodného, a ďalej pokračujeme ako v príklade 4.

Suchý produkt má 0,31 % dusíka.

Vynález má uplatnenie všade, kde je výhodné imobilizovať enzýmy prostredníctvom ich tyrozínových, imidazolových, lyzínových či N-terminálnych zvyškov a kde je potrebné izolovať či čistiť enzýmy a iné bielkoviny obsahujúce tiolové skupiny, a to či už v priemyselnej praxi alebo vo výskume.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy p-aminobenzylcelulózy vhodnej na imobilizáciu enzýmov či afinitnú chromatografiu tielových enzýmov, vyznačujúci sa tým, že celulóza sa v prvom stupni zosieťuje za použitia 15 až 75 % epichlórhydrínu na váhu suchej celulózy, po dobu 1 až 3 hodiny, pri teplote 20 °C až 50 °C, za stáleho miešania, pri hydromodule 10, v druhom stupni sa nechá zosietená celulóza reagovať s p-nitrobenzylchloridom v množstve 1,075 až 3,2 násobnom na suchú váhu celulózy v 11 až 12 % hydroxide sodnom pri hydromodule 10, pri teplote 45 °C až 75 °C, po dobu 3 hodiny, načo sa reakčná zmes vyleje do 15-násobného objemu vody, prefiltruje, premýva vodou, 50 % etanolom, acetónom a extrahuje acetónom v Soxhletovej aparátúre do bezfarebnej reakcie filtrátu, v treťom stupni sa nechá p-nitrobenzylcelulóza reagovať s ditioničitanom sodným v 4-násobnom mólovom prebytku na obsah dusíka v p-nitrobenzylcelulóze, v 1,45 M hydroxide sodnom, pri teplote 65 °C, po dobu 1 hodiny, a nakoniec sa premýva na filtri vodou, 0,1 M kyselinou chlorovodíkovou, vodou, 50 % etanolom a acetónom do bezfarebnej reakcie filtrátu.