



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

214 096

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 25 07 80
(21) PV 5270-80

(51) Int. Cl.³ C 12 N 11/08

(40) Zveřejněno 15 09 81
(45) Vydáno 01 07 84

(75)
Autor vynálezu

KÁŠ JAN ing.CSc., PRAHA, TURKOVÁ JAROSLAVA ing.CSc., ČESKÝ BROD,
HLADÍK JAROSLAV doc.ing.CSc., VERUOVIČ BUDIMÍR ing.CSc., PRAHA,
KUBÁNEK VLADIMÍR doc.ing.CSc., KRALUPY NAD VLTAVOU,
KRÁLÍČEK JAROSLAV prof.ing.DrSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy imobilizovaných enzymů

Vynález se týká imobilizovaných enzymů na mikroporézní polymery a způsobu jejich výroby.

Podstata imobilizovaných enzymů podle vynálezu spočívá v tom, že polymerní nosič, vytvořený například na bázi polyetylenotereftalátu, polykaprolaktamu, polyfenylenoxidu, má mikroporézní strukturu o specifickém povrchu od 1 do 700 m²/g. Podstata způsobu výroby imobilizovaných enzymů podle vynálezu spočívá v tom, že se na polymerní nosič buď nejprve sorbuje enzym, který se dále zesítuje, nebo se nejprve sorbuje síťovací činidlo a vzniklý produkt se nechá reagovat s molekulami enzymů. Je však také možné sorbovat na polymerní nosič síťovací činidlo, na které se vážou enzymy, jež se znovu zesítují síťovacím činidlem. Imobilizace enzymů se může provádět při teplotě 1 až 40 °C a pH prostředí od 4 do 10 po dobu 0,1 až 48 hodin.

Vynález se týká způsobu přípravy imobilizovaných enzymů sestávajících z polymerního nosiče, na který jsou navázány zesíťované molekuly enzymů.

Mikroporézní polymery s vysokým aktivním povrchem, vhodné pro imobilizaci enzymů, se připravují tak, že se polymer rozpustí v roztaveném rozpouštědle a po ochlazení roztoku na kompaktní hmotu, která se podrobí k dalšímu mechanickému zpracování, a tavné rozpouštědlo se dekonale vyextrahuje z polymerní struktury extrakčním činidlem, které dobře rozpouští tavné rozpouštědlo a neatakuje polymer. Získá se polymer obvykle v práškové formě s mikroporézní strukturou.

Tímto postupem byl připraven polymerní sorbent na bázi polyetyléntereftalátu za použití 6-kaprolaktamu jako rozpouštědla a vody jako extrakčního činidla. Specifický povrch u připraveného sorbentu tvořeného polyetyléntereftalátem se pohybuje obvykle od 70 do 80 m²/g, velikost částic činí 20 až 30 μm. Polyetyléntereftalát je bílá práškovitá hmota, s dobrou chemickou a fyzikální stabilitou, o bodu tání 255 °C.

Mikroporézní sorbent na bázi poly-6-kaprolaktamu se dosud připravoval rozpuštěním polykaprolaktamu v kaprolaktamu, při teplotě 200 °C, jako extrakční činidlo pro kaprolaktam se používá voda. Tento sorbent má specifický povrch kolem 15 m²/g a střední průměr sférických částic činí 100 Å s pravidelnou mikroporézní strukturou. Tyto sorbenty jsou chemicky a fyzikálně stálé a mají bod tání 210 °C.

Sorbent na bázi poly-2,6-dimetylfenyloxydu se připravuje za použití kaprolaktamu jako rozpouštědla při teplotě 145 °C a extrakčního činidla vody. Tento sorbent má pravidelnou mikroporézní strukturu s úzkou distribucí pórů o specifickém povrchu 600 m²/g.

Desud známé způsoby mobilizace řady enzymů na různé nosiče jsou nákladné a připravené enzymy mají nízkou aktivitu vzhledem ke hmotnosti a krátký poločas aktivity.

Desavadní nedostatky v mobilizaci enzymů na polymery odstraňuje tento vynález. Podstata vynálezu spočívá v tom, že se enzym při teplotě od 1 do 40 °C a pH prostředí od 4 do 10 navazuje po dobu 0,1 až 48 hodin na polymerní nosič, s výhodou na bázi polyetyléntereftalátu, polykaprolaktamu a polyfenylenoxydu, o specifickém povrchu od 1 do 700 m²/g. Enzym se může nejdříve navázat na polymerní nosič, načež se zasíťuje, nebo se na sorbent adsorbuje nejdříve síťovací činidlo, s výhodou glutaraldehyd, hexamethylendiisokyanát, divinylsulfon, načež se vzniklý produkt nechá reagovat s molekulami enzymů, nebo se na polymerní nosič sorbuje nejdříve síťovací činidlo, na vzniklou kompozici se navážou enzymy a znovu se zesíťují síťovacím činidlem.

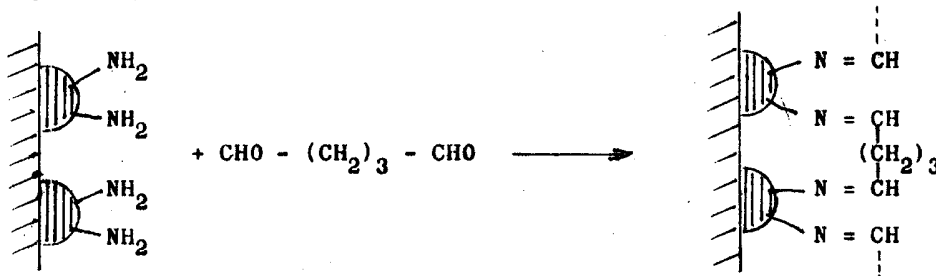
Při praktické realizaci se polymerní nosič o vhodné velikosti částic a vhodné velikosti vnitřních pórů (podle charakteru imobilizovaného enzymu), mající schopnost absorbovat bílkoviny, zbaví nečistot promytím ústojem o nízké molaritě a při pH optimálním pro stabilitu enzymu určeného k imobilizaci. Promytý polymerní sorbent se převrství roztokem síťovacího činidla, např. glutaraldehydem, hexamethylendiisokyanátem, divinylsulfonem v ústojném roztoku o pH optimálním pro stabilitu imobilizovaného enzymu a třepe se při vhodné teplotě (obvykle 20 - 40 °C) po dobu postačující k proniknutí síťovacího činidla do mikroporézní struktury polymerního sorbentu a jeho adsorbci na povrchu sorbentu, 0,5 - 1 hod.

Nosič s adsorbovaným síťovacím činidlem se odsaje a převrství roztokem enzymu v ústro-

ji o pH optimálním pro jeho stabilitu. Takto připravená suspenze se třepe při vhodné teplotě (podle stability imobilizovaného enzymu) po dostatečně dlouhou dobu, až proběhne síťovací reakce do požadovaného stupně. Po skončení reakce se sorbent s imobilizovaným enzymem promývá střídavě ústojem o vhodném pH a ústojem obsahujícím 1 M NaCl až do negativní reakce na síťovadlo a volný enzym v promyvu.

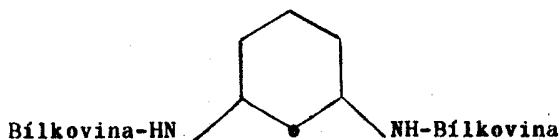
Pro enzymy, které se snadno serbují na daný sorbent, lze použít opačného postupu, to jest promytý sorbent se nejdříve převrství roztokem enzymu, nechá určitou dobu sorbovat a pak se teprve dodá do suspenze roztok glutaraldehydu k provedení zesíťení nasorbovaných molekul enzymu. Další modifikace postupu spočívá v tom, že se síťovací činidlo aplikuje dvakrát, to jest nejprve se nasorbuje činidlo na polymerní nosič, potom se nechá reagovat s enzymy a nakonec se k systému přidá znovu síťovací činidlo a ponechá k reakci, respektive k zesíťení molekul enzymů. Získaný imobilizovaný enzym se po stanovení enzymové aktivity ihned použije nebo se vhodně stabilizuje a skladuje ve formě suspenze ve vhodném ústoji za snížené teploty.

Polymerní sorbenty mají vysoké sorbční vlastnosti pro většinu bílkovin. Vztah mezi množstvím sorbovaného enzymu a pH prostředí je pro různé enzymy různý. Jednotlivé enzymy se rovněž liší v pevnosti sorbční vazby k těmto polymerním sorbentům. Síťovací proces enzymů glutaraldehydem na nosiči lze schematicky znázornit, respektive vysvětlit takto: Aldehydické skupiny glutaraldehydu reagují především s aminoskupinami na povrchu bílkovin za tvorby Schiffovy báze podle reakčního schématu:



Reakce probíhá v širokém rozmezí pH, to jest od 5 do 9. Zvýšená stabilita vzniklých vazeb mezi jednotlivými bílkovinami je podstatně větší než stabilita jednoduché vazby Schiffovy báze. O objasnění tohoto rozdílu se snažila řada autorů (F. M. Richarda a J. R. Knowles, J. Mol. Biol. 37 (1968) 231; P. Monsan et al., Biochemie 57 (1975) 1281; P. M. Hardy et. al., J. Chem. Soc. Perkin (1976) 958; S. Branner-Jorgensen, Enzyme Engineering 4 (1978) 393).

Při porovnání navržených teorií byl učiněn závěr, že vazba mezi molekulami enzymů je typu Schiffovy báze, která je však stabilizována několikanásobnou vazbou početných lysinových zbytků na povrchu bílkovin, které stabilizují iminové vazby proti hydrolýze. Dalším stabilizačním efektem může být tvorba cyklických hydrátů, jako například:



Výsledná vzájemná vazba bílkovin se vyznačuje tudíž vysokou stabilitou.

Jednoduchý způsob přípravy vázaných enzymů za použití poměrně laciného a dostupného polymerního nosiče i dostupných dalších složek je velkou předností vynálezu proti dosud popsaným imobilizovaným enzymům. Přitom enzymy imobilizované na mikroporézní polymer podle vynálezu mají vysokou aktivitu, zvýšenou stabilitu a možnost opakovaného používání. Při použití v kolonových nebo jiných typech enzymových reaktorů dávají možnost kontinuální katalýzy. Imobilizované enzymové deriváty mají dobrou mechanickou pevnost a nejsou napadány mikroorganismy. Svojí jednoduchou a lacinou přípravou i dobrými vlastnostmi dávají možnost ekonomicky výhodných aplikací.

Způsob přípravy imobilizovaných enzymů na polymerních sorbentech podle vynálezu je blíže popsán v následujících příkladech.

Příklad 1.

Práškovitý mikroporézní polyetyléntereftalát o specifickém povrchu $65 \text{ m}^2/\text{g}$ se po dekantaci vodou promyje 0,1 M fosfátovým ústojem pH 6,9, pak převrství 10% roztokem glutaraldehydu v uvedeném ústoji. Vzniklá suspenze se třepe nebo míchá při teplotě 37°C po dobu 1 až 5 hodin. Nezreagovaný glutaraldehyd se odstraní promýváním sorbentu 0,1 M fosfátovým ústojem. Nosič s adsorbovaným síťovadlem se převrství syřidlem, připraveným z telecích žaludků. Reakce pak probíhá při teplotě 4°C po dobu 6 až 12 hodin. Po skončení reakce se imobilizované syřidlo zbavuje volného enzymu střídavým promýváním 0,05 M fosfátovým ústojem pH 5 a tímž ústojem obsahujícím 1 M NaCl až do negativní reakce na přítomnost promývaných látek. Takto připravené imobilizované syřidlo obsahovalo asi 25 mg bílkovin na 1 g suchého nosiče při 20 - 40% zachované enzymové aktivitě. Tímto preparátem lze srážet mléko oddělením primární a sekundární fáze syření.

Imobilizovaným syřidlem lze realizovat první fázi, to jest enzymové štěpení H-kaseinové frakce, při snížené teplotě (až do 25°C). Následným zvýšením teploty mléka, ošetřeného imobilizovaným enzymem, na 35°C dojde k vysrážení mléka. Tak například při 15minutovém průběhu primární fáze syření při 25°C dojde po zvýšení teploty mléka na 37°C k jeho vysrážení během jedné minuty při použití jednoho gramu imobilizovaného enzymu na 50 ml mléka.

Příklad 2.

Polykaprolaktamový sorbent o specifickém povrchu $15 \text{ m}^2/\text{g}$ byl promyt stejným způsobem a aktivován, jak bylo uvedeno v prvním příkladu. Tekuté klasické syřidlo po ředění 0,1 M fosfátovým ústojem pH 6,9 bylo smícháno s aktivovaným nosičem a třepáno při 10°C po dobu 2 až 8 hod. Byl získán preparát s obdobnými vlastnostmi, jak bylo uvedeno v příkladu 1.

Příklad 3.

K 1 g polyetyléntereftalátu o specifickém povrchu $70 \text{ m}^2/\text{g}$, upraveného postupem uvedeným v příkladu 1, bylo přidáno 10 ml roztoku invertasy ředěné 0,05 M fosfátovým ústojem pH 5. Fixace enzymu na sorbent probíhala při 4°C po dobu 8 až 16 hod. Imobilizovaný enzym byl pak promyt stejným postupem jako v příkladu 1. Byly získány preparáty o aktivitě 30 až 60 kat/g suchého nosiče a mající 80 - 98 % zachované aktivity. Množství navázané bílkoviny kolísalo v rozmezí 5 až 15 mg/g nosiče podle čistoty použitého preparátu. Při kontinuální inverzi sacharosy v nepřetržitém provozu byl polečas imobilizovaného enzymu nejméně 22 dní.

Příklad 4.

Na 1 g polyetyléntereftalátu o specifickém povrchu $70 \text{ m}^2/\text{g}$, který byl upraven postupem uvedeným v příkladu 1, byl nalit roztok ureasy v 0,1 M fosfátovém ústoji pH 6,0. Fixace enzymů na nosič probíhala při 4°C po dobu 12 až 16 hod. Po skončení reakce byl imobilizovaný enzym promýván střídavě 0,01 M fosfátovým ústojem pH 6,0 a týmž ústojem obsahujícím 1 M NaCl až do vymizení aktivity ureasy v promyvu a reakce na volný glutaraldehyd. Promytý imobilizovaný enzym byl znovu ponechán k síťovací reakci s glutaraldehydem. Podle množství bílkoviny v roztoku při vazebné reakci se podařilo navázat 50 až 100 % bílkoviny. Množství navázané bílkoviny činilo až 96,8 mg/g nosiče při aktivitě 4345 kat/g nosiče. Purifikací enzymů by bylo možno aktivitu imobilizovaného enzymu ještě podstatně zvýšit.

Příklad 5

15 g dekantovaného polyetyléntereftalátu vodou (cca 15,5 g suchého polymeru bylo suspendováno ve 27 ml 0,1% roztoku papainu o proteolytické aktivitě 0,8 jedn. $A_{280\text{nm}}/\text{min.mg}$ - stanoveno pomocí roztoku denaturovaného hemoglobinu pH 6 při 37°C , v 0,1 M fosfátovém pufru pH 6,5 obsahujícím cystein (100 mg/100 ml) k ochraně volné skupiny papainu nutné pro aktivitu. Po jednogodinovém míchání za teploty místnosti byly do suspenze přidány 3 ml 25% vhodného roztoku glutaraldehydu (výsledná koncentrace glutaraldehydu v suspenzi 2,5 %) a mícháno další 1 hod. Po ukončení vazby byl imobilizovaný papain promýván 0,1 M fosfátovým ústojem, používaným při vazbě s 0,5 % roztokem serumalbuminu v 0,1 M fosfátovém ústoji při 6,5, k urychlení vymytí proteasy. Účinnost promývání byla sledována na základě stanovení proteolytické aktivity v promývkách. Proteolytická aktivita promytého preparátu byla stanovena 6,8 jedn. $A_{280\text{nm}}/\text{min.g}$ suchého vzorku. Množství navázaného papainu stanoveného na základě aminokyselinové analýzy kyselého hydrolyzátu imobilizovaného preparátu bylo 36,6 mg papainu na g suchého vzorku sorsilenu. Na základě těchto hodnot byla relativní proteolytická aktivita imobilizovaného enzymu k aktivitě vázaného množství enzymu v roztoku vypočtena 23,2 % (aktivita rozpustného papainu byla 0,8 jedn. $A_{280\text{nm}}/\text{min.g}$).

Příklad 6.

15 g dekantovaného a odsátého polyfenylenoxidového sorbentu o specifickém povrchu $560 \text{ m}^2/\text{g}$ bylo suspendováno ve 30 ml 5% vodného roztoku glutaraldehydu a mícháno za teploty místnosti 2 hod. Po odsátí byl polymer suspendován ve 27 ml 0,1% roztoku papainu a vazba byla dále prováděna stejně, jak bylo popsáno v příkladu 5. Proteolytická aktivita promytého preparátu byla stanovena 4,4 jedn. $A_{280 \text{ nm}}/\text{min.g}$ suchého vzorku. Množství navázaného papainu, stanovené na základě aminokyselinové analýzy kyselého hydrolyzátu imobilizovaného preparátu, bylo 26,4 mg/g. Relativní proteolytická aktivita činila 20,8 %.

Příklad 7.

15 g dekantovaného a odsátého polykaprolaktamového sorbentu o specifickém povrchu $16 \text{ m}^2/\text{g}$ bylo suspendováno v 30 ml 0,1% roztoku chymotrypsinu v 0,04 M tris (hydroxymethyl) aminomethan-HCl pufru pH 8,0. Po 1 hod. míchání při teplotě 4°C bylo přidáno 10 ml 0,1% roztoku hexamethylendiisothiokyonátu v acetonu a mícháno dalších 24 hod. Po ukončení vazby preparát promýván 1 M NaCl, až v eluátu nebyla detekovatelná proteolytická aktivita a eluát nevykazoval absorbanci při 280 nm. Na základě aminokyselinové analýzy kyselého hydrolyzátu

imobilizovaného chymotrypsinu bylo stanoveno 15,6 mg bílkoviny, navázané na 1 g suchého vzorku. Proteolytická aktivita stanovená pomocí roztoku denaturovaného hemoglobinu pH 8 byla 1,4 jedn. $\cdot A_{280nm}$ /min.g suchého preparátu, esterolytická aktivita, stanovená pomocí roztoku N-acetyl-L-tyrosinethylesteru, byla 1060 μ molů/min.g suchého vzorku. Relativní proteolytická aktivita = 26,4 % (proteolytická aktivita volného chymotrypsinu = 0,34 jedn. $\cdot A_{280nm}$ /min.mg), relativní esterolytická aktivita = 51,5 %, esterolytická aktivita volného chymotrypsinu stanovená pomocí N-acetal-L-tyrosin ethylesteru = 132 μ molů/min. mg.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy imobilizovaných enzymů sestávajících z polymerního nosiče, na který jsou navázány zesíťované molekuly enzymů, vyznačující se tím, že se enzym při teplotě od 1 do 40 °C a pH prostředí od 4 do 10 navazuje po dobu 0,1 až 48 hodin na polymerní nosič, s výhodou na bázi polyethyltereftalátu, polykaprolaktamu a polyfenylenoxidu, o specifickém povrchu od 1 do 700 m²/g.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se na polymerní nosič nejdříve naváže enzym, načež se navázaný enzym zesíťuje.
3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se na sorbent adsorbuje síťovací činidlo, s výhodou glutaraldehyd, hexametylendiisokyanát, divinylsulfon, načež se vzniklý produkt nechá reagovat s molekulami enzymů.
4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se na polymerní nosič nejdříve sorbuje síťovací činidlo, na vzniklou kompozici se navážou enzymy a znovu se zesíťují síťovacím činidlem.