



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU

## K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

249 200

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita  
(22) Přihlášeno 10 12 85  
(21) PV 9062-85

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
C 12 N 9/48

(40) Zveřejněno 17 07 86

(45) Vydáno 01 10 88

(75)  
Autor vynálezu

ŠAFÁŘIK IVO ing. CSc., PRAHA

(54)

Způsob izolace proteolytických enzymů

Izolace se provádí adsorpcí proteinas na částice materiálu, který obsahuje vysoké množství nerozpustné bílkoviny keratinu, jako vlasy a rohovina. Eluce proteinas se provádí roztoky anorganických solí, například sírany a chloridy sodným, draselným nebo amonným, nebo změnou pH elučního roztoku.

Vynález se týká způsobu izolace proteolytických enzymů.

Proteolytické enzymy se používají v nejrůznějších oblastech průmyslu, v medicíně i v biochemických laboratořích. Proteolytické enzymy se většinou z výchozích surovin izolují pomocí různých separačních technik, jako je srážení síranem amonným nebo vychlazenými organickými rozpouštědly, ionexová chromatografie, gelová chromatografie nebo afinitní chromatografie. Z těchto technik je výhodná zejména afinitní chromatografie, která umožňuje získat velmi ~~KRYKEM~~ čisté preparáty proteinas v jednom kroku. Využívá se přitom specifických reverzibilních interakcí mezi ligandem, který bývá imobilizován na vhodném inertním nosiči, a izolovanou proteinasou (Lowe, C.R., Dean, P.D.G.: Afinitní chromatografie, SNTL Praha, 1979, str. 154; Glemža, A.A.: Prikl. Biochim. Mikrobiol. 18, 792 (1982); ~~MM~~ Vesa, V.S.: Prikl. Biochim. Mikrobiol. 16, 629 (1980)).

Příprava typických afinitních sorbentů bývá v mnoha případech náročná, často je nutno použít několikastupňový proces pro aktivaci nosiče, jsou požadovány speciální chemikálie pro aktivaci apod.

Způsob izolace proteolytických enzymů z komplexních směsí podle vynálezu spočívá v tom, že se proteiny obsažené v roztoku adsorbují na materiál, obsahující vysoké množství nerozpustné bílkoviny ~~MM~~ keratinu, s výhodou na vlasy nebo na rohovinu. Jejich eluce se provádí roztoky anorganických solí, s výjimkou solí ovlivňujících enzymovou aktivitu, s výhodou sírany a chloridy sodnými, draselnými a amonnými, nebo je možno eluci provést změnou pH elučního roztoku. Výhodou tohoto způsobu je použití velmi dostupné suroviny (v mnoha případech odpadu) a rovněž to, že uvedený materiál je možno pro izolaci připravit velmi jednoduchým způsobem.

Vynález je dokumentován příklady použití.

#### Příklad 1

Lidské vlasy byly umyty vlasovým šamponem, nastříhány na částice 2-3 mm dlouhé a poté byly suspendovány v horkém (60 °C) 1 % roztoku hydroxidu sodného. Promytí v roztoku hydroxidu sodného bylo ~~MMMMMMMM~~ několikrát opakováno. Poté byly vlasy důkladně promyty vodou. Takto připravený sorbent byl převeden do kolony, a byl důkladně promyt vodou, roztokem chloridu sodného (1 mol.l<sup>-1</sup>) a opět vodou, dokud absorbance vodných a sáliných promyvů při 280 nm a tloušťce vrstvy 1 cm neklesla k nule.

X Na kolonu obsahující lidské vlasy <sup>(12 x 20 cm)</sup> bylo aplikováno 10 mg trypsinu pro bakteriologii rozpuštěného v 10 ml vody. Balastní bílkoviny byly z kolony vymyty vodou. Adsorbovaný trypsin byl z kolony eluován zvýšením iontové síly prostředí (elucí roztokem chloridu sodného, 1 mol.l<sup>-1</sup>). Obsah bílkovin byl stanoven Lowryho metodou (Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)) a aktivita proteiny byla stanovena azokaseinovou metodou (Šafařík, I.: J. Chromatogr. 261, 138 (1983)).

Z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami při eluci vodou vymylo 13,2 % aktivity, při eluci roztokem chloridu sodného se vymylo 60 % aktivity. Specifická aktivita trypsinu se po chromatografii zvýšila 2,1-krát.

## Příklad 2

Za analogických podmínek jako v příkladu 1 byla provedena chromatografie 10 ml kultivačního media po kultivaci *Bacillus* sp., který produkuje extracelulární proteiny. Z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami při eluci vodou vymylo 24,4 % aktivity, při eluci roztokem chloridu sodného  $\text{NaCl}$  ( $1 \text{ mol.l}^{-1}$ ) se v celkovém objemu 130 ml vymylo 70,3 % aktivity. Specifická aktivita proteiny se po chromatografii zvýšila 15-krát.

## Příklad 3

Částice rohoviny (průměr částic 0,3 - 1 mm) byly opakovaně promyty horkou a studenou vodou. Po naplnění do kolony byly promyty jako v příkladu 1.

Na sloupec částic rohoviny o rozměrech 140 x 12 mm bylo nanášeno 10 ml kultivačního media po kultivaci *Bacillus* sp., jako v příkladu 2. Z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami při eluci vodou vymylo 39 % aktivity, při eluci roztokem  $\text{NaCl}$  ( $1 \text{ mol.l}^{-1}$ ) se v celkovém objemu 140 ml vymylo 58 % aktivity. Specifická aktivita proteiny se po chromatografii zvýšila 35-krát.

## Příklad 4

Za analogických podmínek jako v příkladu 1 byla provedena chromatografie trypsinu. K eluci aktivní proteiny bylo rovněž možno použít roztoky chloridu draselného a síranu amonného ( $1 \text{ mol.l}^{-1}$ ).

## Příklad 5

Za analogických podmínek jako v příkladu 3 byla provedena chromatografie extracelulárních bakteriálních proteiny. K eluci aktivních proteiny bylo rovněž možno použít roztok kyseliny chlorovodíkové (cca  $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ )

## Příklad 6

Za analogických podmínek jako v příkladech 1 a 3 bylo rovněž možno izolovat proteiny z pankreatického extraktu a přečistit komerční preparát chymotrypsinu.

## PŘEDMĚT

## VYNÁLEZU

249 200

1. Způsob izolace proteolytických enzymů, vyznačující se tím, že se proteiny obsažené v roztoku adsorbují na částice materiálu, který obsahuje vysoké množství nerozpustné bílkoviny keratinu, s výhodou vlasy nebo rohovina, jejich eluce se provádí roztoky anorganických solí s výjimkou solí, které ovlivňují enzymovou aktivitu, s výhodou sírany a chloridy sodnými, ~~draselnými~~ draselnými a amonnými, nebo je možno jejich eluci provést změnou pH elučního roztoku.