

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

248897

(11) (B1)

/22/ Přihlášeno 12 11 85
/21/ PV 8126-85

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 9/48

(40) Zveřejněno 17 07 86

(45) Vydáno 15 01 88

(75)

Autor vynálezu

ŠAFARŤÍK IVO ing. CSc., PRAHA

(54) Způsob izolace proteolytických enzymů

Izolace se provádí adsorpcí proteolytických enzymů na částice uhlí. Eluce proteinas se provádí roztoky anorganických solí, např. sírany a chloridy sodnými, draselnými a amonnými, nebo změnou pH elučního roztoku.

248897

Vynález se týká způsobu izolace proteolytických enzymů.

Proteolytické enzymy se ze směsí /např. živná média po kultivaci produkčních mikroorganismů, hrubé extrakty živočišných tkání nebo rostlinných pletiv apod./ mohou izolovat celou řadou metod, jako je např. srážení síranem amonným nebo vychlazenými organickými rozpouštědly, ultrafiltrací, ionexovou, gelovou a afinitní chromatografií a dalšími technikami. Pouze při použití afinitní chromatografie je možno získat výrazně přečištěné preparáty proteinas v jednom kroku.

Jako typické příklady izolace proteinas afinitní chromatografií je možno uvést izolaci pepsinu na sloupci polylysín-Sepharosy 4B /Nevaldine, B., Kassell, B.: Biochim. Biophys. Acta 250, 207 /1971//, izolaci pankreatického trypsinu na ovomukoid-Spheronu /Truková, J., Seifertová, A.: J. Chromatogr. 148, 293 /1978//, nebo izolaci proteinas z listů ovsa na hemoglobin-Sepharose /Drivdahl, R. H., Thimann, K.: Plant Physiol. 59, 1059 /1977//.

Typické afinitní sorbenty pro izolaci proteinas jsou připravovány imobilizací vhodných ligandů na nerozpustné nosiče. Přitom je často nutno použít několikastupňový proces pro aktivaci nosiče, jsou vyžadovány speciální chemikálie apod.

Způsob izolace proteolytických enzymů z komplexních směsí podle vynálezu spočívá v tom, že se proteinasy obsažené v roztoku adsorbují na částice uhlí. 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, např. roztokem tetraboritanu dvojsodného nebo hydroxidu amonného.

K izolaci je možno použít jak kolonové, tak i vsádkové uspořádání. Výhodou tohoto způsobu je použití velmi dostupné suroviny /uhlí/ a rovněž to, že uhlí je možno připravit pro izolaci velmi jednoduchým způsobem.

Vynález je dokumentován příklady použití.

P ř í k l a d 1

Skleněná kolona byla naplněna částicemi hnědého uhlí o rozměrech 0,30-0,35 mm, rozptýlenými ve vodě, přičemž byl vytvořen sloupec o rozměrech 180 x 12 mm. Po naplnění byla kolona promyta vodou, roztokem chloridu sodného /1 mol.l⁻¹/ a opět vodou, dokud absorbance promyvů při 280 nm a tloušťce vrstvy 1 cm neklesly k nule. Poté bylo aplikováno 10 ml kultivačního média po kultivaci *Bacillus* sp., který produkuje extracelulární proteinasy.

Balastní bílkoviny byly z kolony vymyty vodou. Adsorbované proteinasy byly z kolony eluovány zvýšením iontové síly prostředí /elucí roztokem chloridu sodného, 1 mol.l⁻¹/. Obsah bílkovin byl sledován Lowryho metodou /Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: J. Biol. Chem. 193, 265 /1951// a aktivita proteinas azokaseinovou metodou /Šafařík, I.: J. Chromatogr. 261, 138 /1983//.

Z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami při eluci vodou vymylo 1,3 % aktivity, při eluci roztokem chloridu sodného se v celkovém objemu 130 ml vymylo 70,7 % aktivity. Specifická aktivita proteinas se po chromatografii zvýšila 51krát.

P ř í k l a d 2

Za analogických podmínek jako v příkladu 1 byla provedena chromatografie 30 mg amorfního trypsinu pro bakteriologii, rozpuštěného v 10 ml vody. Z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami při eluci vodou vymylo 5 % aktivity,

při eluci roztokem chloridu sodného /1 mol.l⁻¹/ se v celkovém objemu 130 ml vymylo 40 % aktivity. Specifická aktivita trypsinu se po chromatografii zvýšila 2,8krát.

P ř í k l a d 3

Za analogických podmínek jako v příkladu 2 byly provedeny chromatografie trypsinu. K eluci aktivní proteinasy bylo rovněž možno použít roztok chloridu draselného /1 mol.l⁻¹/ a síranu amonného /1 mol.l⁻¹/.

P ř í k l a d 4

Za analogických podmínek jako v příkladu 2 byly provedeny chromatografie trypsinu. K eluci aktivní proteinasy bylo rovněž možno použít změny pH elučního roztoku, např. promytím sloupce 4% roztokem hydroxidu amonného nebo 4% roztokem tetraboritanu sodného.

P ř í k l a d 5

Částice uhlí byly před použitím suspendovány v roztoku bílkoviny /1% roztok kaseinu/ a poté důkladně promyty vodou, roztokem chloridu sodného /1 mol.l⁻¹/ a opět vodou, jako v příkladu 1. Byla provedena chromatografie trypsinu jako v příkladu 2. Výtěžnost proteinasy eluované roztokem NaCl /1 mol.l⁻¹/ byla o 10 až 20 % vyšší než v případě, kdy chromatografie probíhala na nemodifikovaném uhlí.

P ř í k l a d 6

Bylo smícháno 50 ml kultivačního média po kultivaci Bacillus sp., který produkuje extracelulární proteinasy, a 20 g jemně mletého uhlí ve 200 ml vody. Po 5 hodinové inkubaci byly částice uhlí odfiltrovány na Büchnerově nálevce a důkladně promyty vodou. Adsorbované proteinasy byly eluovány roztokem síranu amonného /1 mol.l⁻¹/ . Výtěžnost proteolytické aktivity byla 50 %, specifická aktivita se zvýšila 40krát.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob izolace proteolytických enzymů, vyznačující se tím, že se proteolytické enzymy obsažené v roztoku adsorbují na částice uhlí, jejich eluce se provádí roztoky anorganických solí s výjimkou solí, které ovlivňují enzymovou aktivitu, s výhodou sírany a chloridy sodnými, draselnými a amonnými, nebo se eluce provádí změnou pH elučního roztoku.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že částice uhlí jsou před použitím suspendovány v roztoku bílkoviny.