

**POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA**



**URZĄD
PATENTOWY
PRL**

OPIS PATENTOWY

53913

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 09. XI. 1964 (P 106 636)

Pierwszeństwo: _____

Opublikowano: 25. IX. 1967

Kl. 6 a, 22/01

MKP C 12 d



Współtwórcy wynalazku: dr Heinrich Kirchhof, prof. dr G. Pfeleiderer,
dr Kurt Holle

Właściciel patentu: Zellstofffabrik Waldhof, Mannheim-Waldhof (Nie-
miecka Republika Federalna)

Sposób oczyszczania wodnego ekstraktu z materiału roślinnego, zawierającego aktywną 5'-fosforodiesterazę, stosowanego do otrzy- mywania 5'-mononukleotydów z kwasów nukleinowych

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób oczyszczania wodnego ekstraktu z materiału roślinnego, zawierającego aktywną 5'-fosforodiesterazę, stosowanego do otrzymywania 5'-mononukleotydów z kwasów nukleinowych.

Wiadomo, że kwasy nukleinowe można rozszczepić na 5'-mononukleotydy za pomocą enzymów. Jako substancje, zawierające enzymy odpowiednie do tego celu, należy wymienić obok pewnych mikroorganizmów przede wszystkim jad węży. Jednakże wadą stosowania jadów węży jest to, że w wyniku zawartości w nich różnego rodzaju enzymów rozpad jest trudny do kontrolowania i często przebiega aż do wytwarzania nukleozydów. Tak daleko posunięty rozpad w większości przypadków jest niepożądany. Dlatego też usiłowano osłabić enzymatyczne działanie jadów węży przez utrzymanie wysokiej aktywności 5'-fosforodiesterazy i równoczesne obniżenie aktywności 5'-nukleotydyazy. Można to osiągnąć różnymi drogami. Jad węża np. oczyszczano stosując różnego rodzaju operacje wytrącające lub poddawano go działaniu wysokiej temperatury. Jest także rzeczą wiadomą, że jony pewnych metali wykazują zdolność dezaktywizacji. Znałe są również kombinacje opisanych metod dezaktywizacji.

Metody te wykazują jednak wady, gdyż są żmudne, czasochłonne i dają się zastosować tylko przy zachowaniu określonych warunków. Nadto uzys-

2

kanie jadu wężowego, potrzebnego jako materiał wyjściowy, jest kosztowne i niebezpieczne.

Wiadomo, że można uzyskać 5'-mononukleotydy w sposób prosty i tani, jeśli enzymatyczny rozpad kwasów nukleinowych prowadzi się za pomocą wodnych ekstraktów fosforodiesterazy, uzyskanych z materiału roślinnego w obecności rozpuszczalników organicznych w ilości od 5 do 20%, korzystnie 10% całkowitej objętości płynu, po czym z mieszaniny reakcyjnej oddziela się powstałe 5'-mononukleotydy. Stwierdzono bowiem, że materiał roślinny różnego pochodzenia zawiera 5'-fosforodiesterazę, którą można uzyskać w postaci czynnego ekstraktu enzymatycznego przez wylugowanie tego materiału wodą, również w obecności rozpuszczalników organicznych.

Jako materiał roślinny należy rozumieć przede wszystkim rośliny naziemne i/lub podziemne części roślin, jak owoce, nasiona, bulwy, korzenie roślin zwykłych i/lub okopowych, dalej zarodki roślinne, jak również mieszaniny rozmaitych roślin lub ich części, ewentualnie z zarodkami. Jako szczególnie odpowiednie okazały się surowe wyciągi z nasion, zarodków i/lub części składowych zarodków roślin dwu- lub jednoliściennych, jak np. roślin motylkowych, pszenicy, ryżu, jęczmienia i/lub traw, jak również z odpadków otrzymywanych przy słodowaniu.

Na ogół celowe jest wzbogacenie otrzymanego ekstraktu w enzym na drodze niewielu zabiegów

oczyszczających. W tym celu można np. adsorbować enzym na żelu fosforanu wapniowego, który dodaje się do klarownego roztworu, po czym odwirowuje się i wymywa roztworem siarczanu amonowego i roztworem buforowym fosforanu, a następnie wytrąca z roztworu metanolem, etanolem, acetonem lub podobnymi rozpuszczalnikami organicznymi. Przez następujące po tym chromatografowanie usuwa się także obecną jeszcze 5'-nukleotydazę. Poza znacznym nakładem materiałowym i wymaganiem długim czasem prowadzenia procesu istnieje niebezpieczeństwo utraty części cennej 5'-fosfordiesterazy w poszczególnych fazach procesu.

Przedmiotem wynalazku jest sposób oczyszczania wodnego ekstraktu materiału roślinnego, zawierającego aktywną 5'-fosfordiesterazę, stosowanego do otrzymywania 5'-mononukleotydów z kwasów nukleinowych przez krótkotrwałe poddawanie działaniu ciepła wodnych ekstraktów z materiału roślinnego. Ogrzewanie prowadzi się korzystnie w obecności soli metali ciężkich.

Ekstrakty z materiału roślinnego, do których dodaje się organiczne rozpuszczalniki trudno rozpuszczalne lub nierozpuszczalne w wodzie, jak np. toluen lub chloroform w ilości od 0,5 do 3%, korzystnie 1 do 1,5% objętości płynu, podgrzewa się przed ich zastosowaniem do rozszczepiania kwasów nukleinowych do temperatury 45–70°C, korzystnie 55–65°C, w ciągu 5–40 minut, najkorzystnie 15–25 minut.

Ogrzewanie można prowadzić również w obecności soli metali ciężkich. Szczególnie korzystne jest zastosowanie soli nieorganicznych, takich jak chlorki, siarczany i azotany cynku, niklu i miedzi. Stężenie molowe soli metali ciężkich w wyciągach powinno wynosić od 10⁻² do 10⁻⁵.

Nieoczekiwanie stwierdzono, że wartość pH enzymów może wahać się w szerokich granicach, przy czym ze zrozumiałych względów należy unikać obszarów krańcowo kwaśnych lub alkalicznych. W celu daleko idącego dezaktywowania 5'-mononukleotydazy okazało się szczególnie korzystne sprowadzenie pH ekstraktu do wartości 4–7. Proces można prowadzić również w obecności roztworu buforowego, jak na przykład fosforanowego, ftalanowego, octanowego lub trójksoymetyloaminometanowego.

Zachowując powyższe warunki utrzymuje się możliwie maksymalną aktywność 5'-fosfordiesterazy przy równoczesnej jak najdalej posuniętej dezaktywacji 5'-nukleotydazy. Jednocześnie metoda jest szybka i nie wymaga dużego nakładu materiałowego.

Jeżeli proces prowadzi się bez dodatku soli metali ciężkich, to dla osiągnięcia daleko idącej dezaktywacji 5'-nukleotydazy szczególnie celowe jest sprowadzenie pH ekstraktu do wartości 4–7. Stwierdzono jednakże, że rośliny podczas procesu ekstrakcji nie muszą być traktowane roztworem wodnym, nastawionym do określonej wartości pH.

Ekstrakty oczyszczone sposobem według wynalazku używane są bezpośrednio do rozszczepiania kwasów nukleinowych.

Przytoczone poniżej przykłady wyjaśniają sposób według wynalazku.

Przykład I. W celu otrzymania ekstraktu z materiału roślinnego, np. z kielków oczyszczonego siodu jęczmiennego, wprowadza się 10 części wagowych materiału roślinnego do 100 części wagowych wody, a następnie miesza w temperaturze pokojowej przez dwie godziny i odwirowuje. Ekstrakt wykazuje wartość pH = 5÷6 i zostaje za pomocą ługu sodowego lub kwasu octowego sprowadzony do pożądanej wartości pH, podanej w tabelicy I. Następnie wyciąg podgrzewa się w kąpeli wodnej w temperaturach i odstępach czasu podanych w tej tabelicy. Po ogrzewaniu ochładza się i wartość pH sprowadza do 8.

15 części objętościowych wyciągu z kielków z oczyszczonego siodu jęczmiennego, otrzymanego w wyżej opisany sposób, albo wyciągu z innego materiału roślinnego, np. z kielków pszenicznych, dodaje się do 10 części objętościowych roztworu nukleinianu sodowego (2%-go roztworu kwasu nukleinowego) i 12 części objętościowych wodnego roztworu, zawierającego 0,1 mola trój-(oksymetylo)-aminometanu jako buforu o wartości pH = 8,0 z dodatkiem 0,5–3% toluenu. W ślepych próbach zastępuje się roztwór kwasu nukleinowego 10 częściami objętościowymi wody. Czas trwania rozszczepiania enzymatycznego wynosi około 20 godzin przy temperaturze 37°C.

Wyniki podane są w kolumnach 5 i 6 poniższej tabelicy I.

Tabela I

Kolumna	1	2 3 4			5 6	
		Wstępna obróbka ekstraktu			Kwas nukleinowy	
		ogrzewanie		wartość pH	rozszczepienie kwasu nukleinowego %	oddzielenie P ₂ O ₅ %
Doświadczenie	Materiał ekstrahcyjny	temperatura °C	czas ogrzewania w minutach			
1	kielki z oczyszczonego siodu jęczmiennego	55	20	4	81	2,0
2	"	65	20	5	87	1,6
3	"	65	15	6	92	2,3
4	kielki pszenicy	65	20	5	78	5,3
5	"	65	15	6	84	6,1

W dalszej tabelicy II przytoczono przykłady, w których użyto wyciągów z materiałów roślinnych ogrzewanych w obecności soli metali ciężkich.

Przykład II. Wytwarzanie ekstraktu z zarodków: 10 części wagowych kielków z oczyszczonego siodu jęczmiennego i 100 części objętościowych wody, o wartości pH doprowadzonej na początek ekstrakcji ługiem sodowym do 8,0, miesza się dwie godziny w temperaturze pokojowej i następnie odwirowuje. Ekstrakt sprowadza się za pomocą ługu sodowego lub kwasu octowego do pożądanej

wartości pH, podanej w tablicy II. Następnie dodaje się tyle roztworu soli metalu ciężkiego, ażeby osiągnąć pożądaną ilość w molach, podaną również w tablicy II, i ogrzewa w kąpeli wodnej w temperaturach i okresach czasu podanych w tablicy II. Po zakończeniu ogrzewania ekstrakt ochładza się i sprowadza wartość pH z powrotem do 8,0 (kolumny 1—6 w podanej dalej tablicy II).

W celu otrzymania 5'-mononukleotydów, 3 części objętościowe ekstraktu z kielków z oczyszczonego siodu jęczmiennego otrzymanego jak wyżej lub wyciągu z innych roślin, np. z kielków pszenicznych, dodaje się do 2 części objętościowych roztworu nukleinianu sodowego (1,687% roztworu kwasu nukleinowego) i 3 części objętościowych roztworu, zawierającego 0,1 mola trój-(oksymetylo)-aminometanu jako buforu o wartości pH = 8,0 z dodatkiem 0,5—3% toluenu. W jednocześnie prowadzonych ślepych próbach zastępuje się roztwór kwasu nukleinowego dwoma częściami objętościowymi wody. Czas trwania rozszczepiania enzymatycznego wynosi około 20 godzin w temperaturze 37°C.

Wyniki przedstawiono w kolumnach 7 i 8 niżej podanej tablicy II.

Tablica II

Ko- lum- na	1	2	3	4	5	6	7	8
Doświadczenie	Materiał ekstrakcyjny	Obróbka wstępna ekstraktu				Wartość pH	Kwas nukleinowy	
		sól metalu		ogrzewanie			rozszczepienie kwasu nukleinowego	oddzielenie P ₂ O ₅ , %
		wzór chemiczny soli	stężenie mol	temperatura °C	czas ogrzewania w min.			
G	kiełki z oczyszczonego siodu jęczmiennego	CuCl ₂	0,002	65	20	5	87	11
7	"	"	0,002	65	20	5	91	4
8	"	NiCl ₂	0,001	65	20	5	100	15
9	"	"	0,00025	65	20	5	100	18
10	"	"	0,001	65	20	6	100	15
11	"	"	0,00025	65	20	6	100	16
12	"	"	0,001	65	20	7	96	15
13	"	"	0,00025	65	20	7	87	8
14	"	ZnCl ₂	0,01	65	20	4	96	10
15	"	"	0,001	65	20	4	92	3,6
16	"	"	0,01	65	20	6	85	2,6
17	"	"	0,001	65	20	6	79	2,7
18	"	"	0,001	55	5	4	92	32
19	"	"	0,001	55	10	4	97	23
20	"	"	0,001	55	20	4	87	16
21	"	"	0,001	55	40	4	69	2
22	"	"	0,001	55	10	4	97	23
23	"	"	0,001	65	10	4	80	0,5
24	"	"	0,001	65	20	4	75	0,3
25	"	"	0,001	65	40	4	59	0,1

Przykład III. Wytwarzanie ekstraktu z zarodków: 150 g kielków pszenicznych miesza się z 1000 cm³ wody w ciągu dwóch godzin w temperaturze pokojowej i przy wartości pH = 7,5 (uzyskanej przez dodatek roztworu wodorotlenku

potasowego). Następnie mieszaninę odwirowuje się. Po doprowadzeniu ekstraktu do wartości pH = 5 przez dodatek kwasu solnego, dodaje się roztworu chlorku cynkowego tak, aby stężenie molowe wynosiło 0,005 mola ZnCl₂. Na koniec ekstrakt utrzymuje się w temperaturze 65°C przez 20 minut, ochładza i ponownie sprowadza otrzymany ekstrakt z zarodków do wartości pH = 5.

25 cm³ otrzymanego ekstraktu z kielków pszenicznych dodaje się do 25 cm³ 2% roztworu kwasu nukleinowego, wytworzonego z mleczka rybiego i zawierającego kwas dezoksyrybonukleinowy i sprowadza tę mieszaninę do wartości pH = 7,5. Wartość pH utrzymywana jest przez stałe dodawanie rozcieńczonego roztworu wodorotlenku potasowego. Zakończenie rozszczepienia zaznacza się przez ustalenie się wartości pH. Przeciętny czas trwania reakcji prowadzonej w temperaturze 37°C wynosi około 27 godzin. Rozszczepienie kwasu nukleinowego wynosi 85%, oddzielenie P₂O₅—6%.

Przykład IV. Zastosowuje się ekstrakt z zarodków sporządzony w sposób taki, jak w przykładzie II. Jako sól metalu stosuje się ZnCl₂ w takiej ilości, aby stężenie wynosiło 0,001 mola/litr i ogrzewanie prowadzi się przez 20 minut w temperaturze 65°C, przy wartości pH = 5.

40 cm³ otrzymanego wyciągu dodaje się do 10 cm³ 2,5% zobojętnionego roztworu kwasu dezoksyrybonukleinowego. Wartość pH mieszaniny doprowadza się do 8 przez dodanie ługu sodowego. Po 24 godzinach, w czasie których utrzymuje się wartość pH = 8 przez bieżące dodawanie rozcieńczonego ługu sodowego oraz temperaturę inkubatora 37°C, rozszczepienie kwasu nukleinowego wynosi 75% przy oddzieleniu fosforanu sodu w 9,6%.

Przykład V. 50 g wysuszonych w suszarce próżniowej korzonków zarodkowych bobu (Vicia faba) drobno miele się i ekstrahuje 50 cm³ wody utrzymując wartość pH = 8 (NaOH) w ciągu 5 godzin. Ekstrakt ten przez dodanie kwasu solnego doprowadza się do wartości pH = 5 i dodaje do roztworu CuCl₂ tak, że stężenie soli metalu ciężkiego w mieszaninie wynosi 0,0002 mola/litr. Mieszaninę ogrzewa się w ciągu 20 minut w temperaturze 60°C. Po ochłodzeniu doprowadza się ekstrakt z powrotem do wartości pH = 8 przez dodanie ługu sodowego. Do 50 cm³ tego wyciągu dodaje się 40 cm³ roztworu, zawierającego 0,1 mola trój-(oksymetylo)-aminometanu jako buforu o wartości pH = 8 z dodatkiem chloroformu i 10 cm³ 2,5% roztworu nukleinianu sodowego i ogrzewa mieszaninę do temperatury 37°C. Po 18 godzinach rozszczepienie enzymatyczne kwasu nukleinowego wynosi 92%.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób oczyszczania wodnego ekstraktu z materiału roślinnego zawierającego aktywną 5'-fosfordiesterazę, stosowanego do otrzymywania 5'-mononukleotydów z kwasów nukleinowych, **znamienny tym**, że surowy ekstrakt poddaje się ogrzewaniu w obecności metali ciężkich w ciągu krótkiego okresu czasu, a następnie ochładza.

7

2. Sposób według zastrz. 1 **znamienny tym**, że ekstrakt poddaje się ogrzewaniu w ciągu 5—40 minut, korzystnie 15—25 minut do temperatury 45—70°C, korzystnie 55—65°C i następnie ochładza do temperatury otoczenia.
3. Sposób według zastrz. 1 i 2 **znamienny tym**,

8

- że jako sole metalu ciężkiego stosuje się chlorki cynku, niklu lub miedzi.
4. Sposób według zastrz. 1—3 **znamienny tym**, że ogrzewaniu poddaje się ekstrakt, w którym stężenie molowe soli metalu ciężkiego wynosi 10⁻² — 10⁻⁵.