

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUBOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

88532

Patent dodatkowy
do patentu _____

Zgłoszono: 04.03.72 (P. 166381)

Pierwszeństwo: _____

Zgłoszenie ogłoszono: 02.01.75

Opis patentowy opublikowano: 31.07.1978

MKP C07g 7/02
C12d 13/10

Int. Cl.² C07G 7/02
C12D 13/10

CZYTELNIA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej

Twórcy wynalazku: Konstancja Raczyńska-Bojanowska, Zbigniew Ruczaj

Uprawniony z patentu: Instytut Przemysłu Farmaceutycznego,
Warszawa (Polska)

Sposób izolacji proteaz

Przedmiotem wynalazku jest sposób izolacji proteaz z przesączy hodowlanych po oddzieleniu Zn-bacytracyny.

Znany jest sposób jednoczesnego wytwarzania bacytracyny i proteaz w procesie hodowli np. *Bacillus subtilis* w warunkach konwencjonalnych. Z otrzymanej tym sposobem brzezki hodowlanej izoluje się bacytracynę w postaci kompleksu z cynkiem przy wartości pH 5–7, a następnie wyodrębnia się proteazy przez zagęszczenie supernatantu i ewentualnie frakcjonowane wytrącanie enzymu.

Stwierdzono, że proteazy można izolować z przesączy hodowlanych po oddzieleniu Zn-bacytracyny zwiększając stężenie jonów cynku przez dodanie tych samych soli, które stosuje się przy wytrącaniu antybiotyku, przy jednoczesnej zmianie wartości pH środowiska. Sposób ten pozwala uniknąć kłopotliwego procesu oddzielania związków drobnocząsteczkowych oraz odparowywania roztworów wodnych enzymów pod zmniejszonym ciśnieniem i otrzymać wytrącony preparat enzymatyczny w prosty sposób, w zmniejszonej objętości i pozbawiony innych zanieczyszczeń białkowych, z roztworów o różnej zawartości proteaz i aktywności proteolitycznej.

Według wynalazku sposób izolacji proteaz polega na tym, że przesącz hodowlany po oddzieleniu Zn-bacytracyny alkaliczuje się do wartości pH 7–10, korzystnie do wartości pH 8–8,5, dodaje się do niego soli cynkowej do stężenia jonów cynku do 180 mM, korzystnie do stężenia 60–90 mM, wytrącony osad ekstrahuje się wodnym roztworem fosforanu jednosodowego o stężeniu 0,1–0,25 M, a następnie wytrąca się enzymy przez frakcjonowane wysalanie ekstraktu siarczanem amonowym przy wartości pH 6–10, korzystnie przy wartości pH około 8, oraz suszy.

Przykład I. Przesącz po oddzieleniu Zn-bacytracyny zawierający 4040 j proteazy/ml alkaliczowano do wartości pH 10 przy użyciu 10 n NaOH i dodawano 20% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w takiej ilości, aby doprowadzić stężenie ZnSO_4 w roztworze do wartości 1,5%, przy ciągłym mieszaniu. Mieszaninę o wartości pH 7,8 pozostawiono na okres 1 godziny, osad oddzielono przez dekantowanie i wirowanie i ekstrahowano 0,25 M roztworem NaH_2PO_4 1/5 objętości roztworu wyjściowego przez godzinę i ponownie 1/8 objętości roztworu wyjściowego w ciągu 12 godzin w temperaturze 0–4°C. Wydajność ekstrakcji wynosi 87% aktywności proteolitycznej w odniesieniu

do roztworu wyjściowego. Z połączonych ekstraktów wysalano enzym przy 60% nasyceniu siarczanem amonowym, przez 12 godzin w temperaturze 0–4°C i oddzielony osad liofilizowano. Z 1 litra wyjściowego roztworu uzyskano 4,9 g preparatu o aktywności 680 j proteazy/mg suchej masy, co stanowi 81% wydajności. Aktywność właściwa preparatu jest około 10-krotnie wyższa w stosunku do roztworu wyjściowego.

Przykład II. Proteazy wytrącono jak w przykładzie I z przesączu zawierającego, po oddzieleniu Zn-bacytracyny, 8100 j/ml aktywności proteazowej. Wytrącanie przeprowadzano przy wartości pH 8,15. Ekstrakcję przeprowadzono dwukrotnie 1/3 objętości roztworu wyjściowego za pomocą 0,25 M NaH_2PO_4 . Z połączonych ekstraktów proteazy wysolono enzym za pomocą siarczanu amonowego jak w przykładzie I. Z 1 litra wyjściowego roztworu uzyskano 6 g preparatu o aktywności 1140 j/mg suchej masy, co stanowi 84% wydajności. Aktywność właściwa preparatu jest około 5-krotnie wyższa w stosunku do roztworu wyjściowego.

Przykład III. Z przesączu zawierającego po oddzieleniu Zn-bacytracyny proteazy w stężeniu 12500 j/ml wytrącono enzym za pomocą 20% roztworu $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ doprowadzając stężenie ZnSO_4 do wartości 2,0% przy ciągłym mieszaniu, przy wartości pH 8,5. Ekstrakcję i wysalanie przeprowadzono jak w przykładzie I, uzyskując z 1 litra roztworu wyjściowego 9,8 g preparatu o aktywności proteazowej 850 j/ml, co stanowi 68% wydajności. Aktywność właściwa preparatu jest około czterokrotnie wyższa w stosunku do roztworu wyjściowego.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób izolacji proteaz z przesączu hodowlanych po oddzieleniu Zn-bacytracyny, z n a m i e n n y t y m, że przesącz alkalizuje się do wartości pH 7–10, korzystnie do wartości pH 8–8,5, dodaje się do niego soli cynkowej do stężenia jonów cynku 180 mM, korzystnie do stężenia 60–90 mM, wytrącony osad ekstrahuje się wodnym roztworem jednosodowego fosforanu o stężeniu 0,1–0,25 M, a następnie wytrąca się enzymy przez frakcjonowane wysalanie ekstraktu siarczanem amonowym przy wartości pH 6–10, korzystnie przy wartości pH około 8 i suszy.