



FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

269 551

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl. ⁴
C 12 N 9/72

(21) PV 6545-87.D

(22) Prihlásené 10 09 87

(40) Zverejnené 12 09 89

(45) Vydané 29 01 91

(75) Autor vynálezu

DOBRÁNSKY TOMÁŠ ing.,
SOVA OTO MUDr. CSc., KOŠICE,
VODRÁŽKA ZDENĚK prof. ing. RNDr. DrSc.,
KRÁLOVÁ BLANKA doc. ing. CSc.,
DEMNEROVÁ KATEŘINA doc. ing. CSc., PRAHA

(54)

Spôsob izolácie urikázy z biologických
materiálov

(57) Riešenie sa týka nového spôsobu izolácie a čistenia urikázy v priemyselnej výrobe z biologických materiálov. Je založené na využívaní existencie izoelektrického bodu enzýmu urikázy, kde sa autofosforiláciou pôsobením jednosmerného elektrického prúdu pri napätí 200 až 1 000 V vylučuje zo zmesi enzýmov a bielkovín v roztoku vodivosti 100 až 800 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ pri pH 10,3 až 11,1. Táto frakcia sa podrobí deľiacej technike využívajúcej rozdielne molekulové hmotnosti, s výhodou gélovej chromatografie. Opakovaním alebo zamieňaním oboch techník možno dosiahnuť superčistý enzým potrebný hlavne v klinickej biochémii a iných odvetviach.

Vynález sa týka nového spôsobu izolácie a čistenia enzýmu urikázy (EC 1.7.3.3.) v priemyselnej výrobe, ktorý využíva existenciu izoelektrického bodu tohoto enzýmu ako kritéria jeho čistoty.

Podľa doterajších postupov sa urikáza čistila niekoľkými pochodmi, zahrňujúcimi zrážanie síranom amónnym, etanolom, acetónom, ďalej rôznymi systémami gélovej a ionto-meničovej chromatografie či elektroforézou v rôznych usporiadaniach. Ich spoločnou nevýhodou bola prácnosť, náročnosť na vybavenie, pričom čistota enzýmu bola na úrovni zmesi bielkovín približne rovnakej molekulovej hmotnosti, kde podstatnú časť tvoril enzým, ale obsah prímеси bol ± 5 až 10%. Tieto balastné bielkoviny znižujú mernú aktivitu a spôsobujú aj iné vedľajšie efekty, ako postupnú degradáciu izolátu.

V našich vynálezoch CS AO 211 856 a 234 801 sa chráni principiálne nový spôsob delenia a čistenia látok na základe ich izoelektrického bodu spôsobom samočinnnej izoelektrickej fokusácie pôsobením jednosmerného elektrického prúdu v rovnomernom roztoku delenej látky, ktorý je mechanicky stabilizovaný, ako aj jednoduché zariadenie na uskutočňovanie tohoto spôsobu.

Vyššie opísané nedostatky doterajších čistiacich a izolačných postupov v podstatnej miere odstraňuje vynález, ktorého podstata spočíva v tom, že vodivosť biologického materiálu, ktorý obsahuje urikázovú aktivitu, ultrafiltráciou, alebo dialýzou upraví na hodnoty 100 až 800 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ a obsah bielkovín sa upraví na hodnoty 1 až 30 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Roztok sa potom autofokusuje jednosmerným elektrickým prúdom pri napätí 200 až 1 000 V a príkone 3 W a roztok s najvyššou aktivitou, s výhodou pri pH 10,3 až 11,1 sa izoluje a podrobí deliacej technike využívajúcej ako kritérium rozdielnu molekulovú hmotnosť delených látok, s výhodou gélovú chromatografiu, pričom v závislosti na požadovanej čistote sa jedna alebo obe deliace techniky opakujú aspoň jedenkrát.

Vynález je vhodný pre získavanie superčistej urikázy v technologickom meradle pri výrobe tohoto enzýmu pre potreby klinickej biochémie a iné odvetvia.

Príklad č. 1

Kultúra kvasiniek *Candida utilis* sa podrobí odstredeniu pri 0°C a získaná biomasa sa homogenizuje sonikáciou. Homogenát sa znova odstredí a supernatant homogenátu buniek *C. utilis* sa nariedi borátovým tlmivým roztokom pH 8,5 a iontovej sily 0,01 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ obsahujúcim sodné a borátové ióny stabilizujúce aktivitu urikázy tak, aby vodivosť roztoku po nariedení na objem autofokusačnej aparatury bola v rozmedzí 100 až 800 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. Hrubé množstvo bielkovín v tomto roztoku má byť v rozmedzí 1 až 30 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Tento roztok aurového enzýmu sa aplikuje do autofokusačnej aparatury, ktorá sa napojí na zdroj jednosmerného prúdu tak, aby súčin prúdu a napätia nepresiahol 3 W pri 4°C. Proces autofokusácie je ukončený, keď prúd klesne pri napätí 1 000 V na nulu. V autofokusačnej aparatúre sa vytvorí stúpajúce rozhranie pH v každej pracovnej komôrke od anódy ku katóde. Urikáza sa nachádza vo frakciách s pH medzi 10,3 až 11,1. Obsah komôrok s uvedeným pH sa zjednotí a podrobí gélovej chromatografii na stĺpci molekulového sita Spheron P-40 rozmerov 80 x 5 cm, ekvilibrovanú tlmivým roztokom opísaným vyššie. Chromatografia sa uskutočňuje pri prietoku 120 $\text{ml} \cdot \text{h}^{-1}$ a 10 mililitrové frakcie sa zhromažďujú automatickým zberačom frakcií. Čistá urikáza sa nachádza vo frakcii spomedzi dvoch vrcholov v tom, ktorý má nižšiu molekulovú hmotnosť. Jednotlivé kroky čistenia môžu byť opakované podľa potreby stupňa čistoty.

Príklad č. 2

Kultúra baktérií *Aspergillus niger* sa podrobí odstredeniu a získaná biomasa sa homogenizuje dezintegráciou balotínou. Získaný homogenát sa znova odstredí a supernatant homogenátu buniek *A. niger* obsahujúci urikázovú aktivitu sa nariedi Britton-Robinsono-

vým univerzálnym tlmivým roztokom iontovej sily $0,01 \text{ mol.l}^{-1}$ a pH 8,69 tak, aby vodivosť zriadeného homogenátu po nariadení na objem autofokusačnej aparatury bola v rozmedzí 100 až $800 \mu\text{S.cm}^{-1}$ a obsah bielkovín v rozmedzí 1 až 30 g.l^{-1} . Ďalšie čistenie autofokusáciou sa deje podľa príkladu č. 1. Delenie gélovou chromatografiou sa uskutočňuje na stĺpci molekulového sita Sephadex G.100 rozmerov $42 \times 2 \text{ cm}$ totožným tlmivým roztokom pri prietoku 100 ml.h^{-1} a odebierajú sa 5 ml frakcie. Čistá urikáza sa opäť nachádza vo frakcii s nižšou molekulovou hmotnosťou spomedzi dvoch vrcholov.

Príklad č. 3

Kultúra mikrobiálneho kmeňa *Alternaria species* sa podrobí odstreďeniu a získaná biomasa sa dezintegruje metódou prudkého ochladenia spojeného s vysokým tlakom v zariadení pôsobením strižných síl (X-press). Homogenát sa znova odstreďí a číry supernatant homogenátu buniek *A. species* sa nariedi Kolthoff-Vleeschouwerovým tlmivým roztokom iontovej sily $0,015 \text{ mol.l}^{-1}$ a pH 8,4, ktorého sodné, draselné borátové a fosfátové ióny prispievajú k stabilizácii enzýmu. Úprava vodivosti, autofokusácia a ostatné kroky čistenia sa opakujú ako v bode 1.

Príklad č. 4

Kultúra kvasiniek *Candida albicans* sa podrobí odstreďovaniu a ostatným procedúram po autofokusácii ako v príklade č. 1. Po zjednotení obsahu komôrok s pH 10,3 až 11,1 sa roztok podrobí ultrafiltrácii systémom AMICON tak, aby boli všetky zložky s molekulovou hmotnosťou cez 30 000 koncentrované. Potom sa koncentrát podrobí ďalšej ultrafiltrácii usporiadanej tak, že filtre príslušnej kvality eliminuje do filtrátu všetky zložky s molekulovou hmotnosťou pod 40 000. Keďže urikáza z kvasiniek *C. albicans* má molekulovú hmotnosť 34 000 tým dochádza k jej vyčisteniu.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob izolácie urikázy z biologických materiálov vyznačujúci sa tým, že sa dialýzou, alebo ultrafiltráciou upraví vodivosť biologického materiálu na 100 až $800 \mu\text{S.cm}^{-1}$ a obsah bielkovín na 1 až 30 g.l^{-1} a roztok s enzymatickou aktivitou sa potom autofokusuje jednosmerným elektrickým prúdom pri napätí 200 až $1\,000 \text{ V}$, pokiaľ prúd neklesne na nulu a roztok s najvyššou enzymatickou aktivitou, s výhodou pri pH 10,3 až 11,1 sa izoluje a podrobí deliacej technike využívajúcej rozdielnú molekulovú hmotnosť delených látok, s výhodou gélovú chromatografiu, pričom v závislosti na požadovanej čistote sa jedna alebo obe deliace techniky opakujú aspoň jedenkrát.