



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

235405

(11) (B1)

(22) Přihlášeno 02 02 83
(21) (PV 656-83)

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/48

(40) Zveřejněno 17 09 84

(45) Vydáno 15 11 86

(75)

Autor vynálezu

ŠAFAŘÍK IVO ing., SLANÝ, VODRÁŽKA ZDENĚK doc. ing. DrSc., PRAHA

(54) Způsob izolace proteolytických enzymů

Isolace podle vynálezu se provádí pomocí ve vodě nerozpustného termicky modifikovaného kaseinu. Eluce enzymů se provádí roztoky anorganických solí, například síranem a chloridem sodným, draselným nebo amonným. Termická modifikace kaseinu se provádí při 150 až 250 °C po dobu 30 až 180 minut.

Vynález se týká způsobu izolace proteolytických enzymů.

Proteolytické enzymy je možno ze směsí izolovat celou řadou metod. Významné místo mezi nimi zaujímá afinitní chromatografie, využívající specifických reversibilních interakcí mezi ligandem (substrát, analog substrátu, inhibitor, protilátka), který bývá imobilizován na vhodném inertním nerozpustném nosiči, a izolovanou proteázou [Vesa, V.S.: Prikl. Biochim, Mikrobiol. 16, 629 (1980); Lowe, C.R., Dean, P.D.G.: Afinitní chromatografie, SNTL Praha, 1979, str. 154].

Jako typické příklady je možno uvést izolaci proteas z mouky ze sladované pšenice na sloupci hemoglobin-Sepharosy (Chua, G.K., Bushuk, W.: Biochim. Biophys. Res. Commun. 37, 545 (1969)), izolaci hovězího tripsinu na sloupci ovomukoid-Sepharosy 2B (Freinstein, G.: FEBS Lett. 7, 353 (1970)) nebo izolaci proteas z hovězí pankreatické šťávy na sloupci Sepharosy s navázaným inhibitorem trypsinu ze sojových bobů (Reeck, G. R., Walsh, K. A., Neurath, H.: Biochemistry 10, 4 690 (1971)).

V některých případech je možno pro separaci specifických proteolytických enzymů použít nerozpustnou bílkovinu jako substrát, bez imobilizace na nosič. Jedná se např. o separaci kolagenázy z *Clostridium histolyticum* na nativních vlákních kolagenu. Kolagenáza se poté uvolní odbouráním substrátu (Gallop, P.M., Seifter, S., Meilman, E.: J. Biol. Chem. 227, 891 (1957)).

Afinitní sorbenty pro izolaci proteáz jsou dosud připravovány imobilizací vhodných ligandů na nerozpustné nosiče. Často je nutno použít několikastupňový proces pro aktivaci nosiče, jsou vyžadovány speciální chemikálie.

Podstata způsobu izolace proteolytických enzymů z komplexních směsí podle vynálezu spočívá v tom, že se izolace provádí pomocí ve vodě nerozpustného termicky modifikovaného kaseinu. Eluce se provádí roztoky anorganických solí, s výjimkou solí ovlivňujících enzymovou aktivitu, s výhodou sírany a chloridy sodnými, draselnými a amonnými. Termická modifikace kaseinu se provádí při teplotě 150 až 250 °C po dobu 30 až 180 min. K izolaci lze použít tradiční kolonové uspořádání. Další výhodou tohoto způsobu izolace je jednoduchá příprava afinitního sorbentu z velmi dostupné suroviny kaseinu jednoduchým způsobem.

Vynález je dokumentován příklady použití

Příprava sorbentu

Kasein podle Hammarstena (Lachema, ČSSR nebo Reanal, MLR), který je dodáván v granulované formě (průměr většiny granulí = 1 mm) byl bez jakékoliv úpravy zahřát v tenké vrstvě v horkovzdušném sterilátoru na teplotu 190 °C po dobu 30 až 180 minut, resp. na teplotu 230 °C po dobu 120 minut. Získaný tepelně modifikovaný kasein (žluté až temně hnědé barvy, v závislosti na teplotě a době záhřevu) byl promýván 0,5 až 1% roztokem NaOH, vodou, roztokem síranu amonného (1 mol/l) a opět vodou. Promývání bylo několikrát opakováno, dokud absorbance vodných a síranových promyvů při 280 nm a tloušťce vrstvy 1 cm nebyla menší než 0,01 až 0,03.

P r í k l a d

Skleněná kolona (130 x 18 mm) byla naplněna připraveným sorbentem (získán při zahřívání kaseinu při teplotě 230 °C po dobu 120 minut) rozptýleným ve vodě. Po naplnění a ekvilibraci kolony bylo aplikováno 10 ml modelového vzorku (100 mg enzymového hydrázy kaseinu a 5 mg trypsinu v 10 ml vody). Balastní bílkoviny byly z kolony vymyty vodou. Adsorbovaná proteáza byla z kolony eluována zvýšením iontové síly prostředí (elucí 1 M/NH₄/2SO₄). Obsah bílkovin byl sledován Lowryho metodou a aktivita proteázy azokaseinovou metodou za následujících podmínek stanovení: 1 ml 1% roztoku azokaseinu v 0,1 M fos-

fátovém pufru pH 7,0 se smísí s 0,5 ml vzorku, po 30 minutách inkubace při 37 °C se přidá 1,5 ml 5% kyseliny trichloroctové. Po odstředění se měří absorbance při 366 nm proti srovnávacímu roztoku při tloušťce vrstvy 1 cm. Linearita je zaručena do hodnoty absorbance 2.

Z aplikované proteolytické aktivity se 75 % eluovalo v prvních 90 ml efluentu po změně elučních podmínek (elucí roztokem síranu amonného). S balastními bílkovinami se vodou eluovalo 13,4 % aktivity. Specifická aktivita se po chromatografii zvýšila 10,6 x.

Příklad 2

Za analogických podmínek jako v příkladu 1 byla provedena chromatografie 15 mg trypsinu (cca 5 let starý preparát) rozpuštěného v 10 ml vody. Z aplikované proteolytické aktivity se 81,2 % eluovalo v prvních 140 ml efluentu po započetí eluce roztokem síranu amonného. S balastními bílkovinami se vodou eluovalo 10,6 % proteolytické aktivity. Specifická aktivita se po chromatografii zvýšila 2,2 x.

Příklad 3

Za analogických podmínek jako v příkladu 1 byla provedena chromatografie 700 mg trypsinu rozpuštěného v 50 ml vody pro určení kapacity připraveného sorbentu. Po eluci nenavázaného trypsinu a balastních bílkovin vodou byl adsorbovaný trypsin eluován roztokem síranu amonného. Kapacita sorbentu je přibližně 0,5 mg čistého trypsinu na 1 ml sorbentu.

Příklad 4

Byla provedena chromatografie modelového vzorku (100 mg enzymového hydrolyzátu kaseinu a 10 mg trypsinu v 10 ml vody) ve skleněných kolonách naplněných různě tepelně modifikovaným kaseinem (rozměr sloupce 200 x 10 mm). Jako sorbent byl použit kasein modifikovaný 30 min/190 °C, 60 min/190 °C, 90 min/190 °C, 180 min/190 °C, 120 min/230 °C, 180 min/150 °C, 30 min/250 °C a 60 min/250 °C. Ve všech případech měla chromatografie analogický průběh, výtěžnost vnesené proteázové aktivity byla vyšší než 75 %. Specifická aktivita se zvýšila 10 x až 15 x. Získané hodnoty jsou uvedeny v tabulce.

Tabulka 1

Vliv teploty a doby záhřevu kaseinu na výtěžnost vnesené proteolytické aktivity a vzrůst specifické proteolytické aktivity

Teplota °C	Doba záhřevu min.	Výtěžnost %	Vzrůst spec. aktivity
150	180	76,3	11,0
190	30	77,7	10,8
190	60	76,8	10,3
190	90	77,0	11,2
190	180	78,3	12,0
230	120	88,6	14,6
250	30	79,2	13,1
250	60	77,9	12,8

P ř í k l a d 5

Na koloně o rozměrech 200 x 10 mm (použit kasein modifikovaný 180 min/190 °C) byla provedena chromatografie kyselého vyčištěného hovězího pankreatického extraktu. Extrakt byl před aplikací na kolonu 24 hod dialyzován proti tekoucí vodovodní vodě a poté nechán 24 hod při laboratorní teplotě, aby byla umožněna konverze trypsinogenu a chymotrypsinogenu na aktivní proteasy. Bylo aplikováno 10 ml roztoku, po eluci balastních bílkovin vodou byly adsorbované proteasy eluovány roztokem NaCl (1 mol/l). Z aplikované proteolytické aktivity se 70,6 % elovalo v prvních 154 ml efluentu po začátku eluce roztokem NaCl. S balastními bílkovinami se vodou elovalo 23,8 % proteolytické aktivity. Specifická aktivita se po chromatografii zvýšila 2,75x.

Analogické výsledky byly dosaženy, jestliže byl k eluci použit roztok KCl (1 mol/l).

P ř í k l a d 6

Na koloně o rozměrech 210 x 12 mm (byl použit kasein modifikovaný 180 minut/190 °C) byla provedena chromatografie kultivačního média po kultivaci mikroorganismu *Bacillus* sp. (isolován z půdy), který do média produkuje extracelulární proteolytické enzymy. Po odstředění buněk bylo na kolonu aplikováno 10 ml média. Po vymytí balastních bílkovin vodou byly adsorbované proteasy eluovány 1 M NaCl. S balastními bílkovinami se při eluci vodou vymylo 16,6 % z celkově aplikované proteolytické aktivity, při eluci 1 M NaCl se vymylo v celkovém objemu 150 ml 73,2 % aktivity. Specifická aktivita proteas se po chromatografii zvýšila 48 krát.

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 izolace provádí pomocí ve vodě nerozpustného při teplotě 150 až 250 °C po dobu 30 až 180 minut termicky modifikovaného kaseinu, eluce se provádí roztoky anorganických solí s výjimkou solí, které ovlivňují enzymatickou aktivitu, s výhodou sírany a chloridy sodnými, draselnými nebo amonnými.