

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

182171

Nemzetközi osztályozás:

(51) NSZO₃

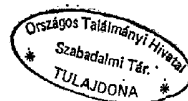
C 12 N 9/78

Bejelentés napja: (22) 1980. VII. 17. (21) 1782/80

Elsőbbsége:

Közzététel napja: (42) 1983. II. 28.

Megjelent: 1987. V. 25.



(72)
dr. Boros László, biokémikus, 20% Daróczy Iván, vegyész,
20%, Huber Irén, élelmiszeripari technikus, 10%, Ivony
Józsefné, üzemmérnök, 10%, Budapest, Kiss Jánosné, ve-
gyész, 5%, Szeged, dr. Szajáni Béla, biokémikus, 35%,
Budapest

(73)
REANAL Finomvegyszergyár, Budapest

(54)
Eljárás aminoaciláz enzim elkülönítésére emlősök veséiből

(57)KIVONAT

A találmány tárgya javított eljárás aminoaciláz enzim elkülönítésére emlősök veséiből. A találmány értelmében úgy járnak el, hogy önmagában ismert módon előállított emlősvese-extraktumot 5)15 percig 60-80 °C-on hőkezelésnek vetnek alá, a hőkezelt elegyet centrifugálják, a felülszóhoz literenként 200-300 g K₂A általános képletű só adnak - ahol K egyvegyértékű kationt jelent. A valamely szervesetlen sav anionját jelenti, és x egyenlő az anion vegyértékével -, a kapott szuszpenziót centrifugálják, az elkülönített csapadékot vízben oldják és vízzel szemben dializálják, majd kívánt esetben a dializált oldatot, illetve az oldatból elkülönített enzim 6,5 és 8,5 közötti pH-értékű pufferoldattal készített oldatát anioncserés kromatográfiának vetik alá. A találmány szerinti eljárással egyszerűen állítható elő igen nagy fajlagos aktivitású aminoaciláz.

A találmány tárgya javított eljárás aminoaciláz enzim elkülönítésére emlősök /elsősorban sertések/ veséiből.

Ismert, hogy az aminoaciláz enzim a sertésvesékben fordul elő a legnagyobb koncentrációban; így az aminoaciláz elkülönítésére alkalmazott ismert módszerek szerint kiindulási anyagként sertésvesét használnak fel.

A J. Biol. Chem. 178, 503 /1949/ közlemény szerint az aminoaciláz elkülönítése során a sertésvese-kéreg vizes extraktumát 78 %-os etanollal 15 %-os etapolkoncentráció eléréséig telítik, az elegyet 12 órán át -6°C -on állni hagyják, majd centrifugálják, és a felülusztót etanollal 30 %-ra telítik. Az elegy pH-ját 6,3-ra állítják, majd -15°C -on újabb 12 órán át állni hagyják. A csapadékot centrifugálással eltávolítják, a felülusztó pH-ját 5,1-re állítják, és az elegyet újabb 12 órán át állni hagyják. A kivált csapadékot - amely az aminoacilázt tartalmazza - centrifugálással különítik el. Az így kapott termék fajlagos aktivitása körülbelül négyszerese a kiindulási extraktuménak, ami igen csekély tisztítási hatásoknak felel meg.

A J. Biol. Chem. 194, 455 /1952/ közlemény hat frakcionálási lépésből és azt követő liofilizálásból álló műveletsort ismert az aminoaciláz elkülönítésére sertésvese vizes extraktumából. Ez az eljárás körülbelül 30-szoros /tehát még mindig viszonylag csekély/ tisztítási hatásokkal szolgáltatja az aminoacilázt, és az előzőekben ismertetett módszernél lényegesen munkaigényesebb. A liofilizált termék fajlagos aktivitása mindössze 4640 egység/mg.

A Biochem. Z. 336, 162 /1962/ szakcikkekben ismertetett eljárással igen tiszta 715 686 egység/mg fajlagos aktivitású aminoacilázt lehet elkülöníteni sertésvese vizes extraktumából. Az eljárás hátránya azonban az, hogy kilenc hosszadalmas, idő- és munkaigényes elkülönítési és tisztítási műveletet igényel.

A Blochimija 22, 838 /1957/ közleményben ismertetett eljárásban kiindulási anyagként sertésveséből készített acetontport használnak fel. Az acetontport foszfátpufferrel extrahálják, az extraktumot két lépésben ammóniumszulfáttal telítik, és a kapott szuszpenziót dializálják. A dialízis után kapott oldatot 5 percre 60°C -on hőkezelik, majd két lépésben telített ammóniumszulfát-oldattal frakcionálják. A képződött csapadék vizes oldatát ismét dializálják, majd az oldatot kétlépéses acetonos frakcionálásnak vetik alá. Az utolsó frakcionálási lépésben kapott csapadékot vízben oldják, az oldatot desztillált vízzel szemben dializálják, végül fagyaszttva szárítják. Ezzel az eljárással, amely 12 műveleti lépésből áll, körülbelül 15 000 egység/mg aktivitású termék állítható elő.

Az ismert eljárások közös hátránya tehát az, hogy az aminoacilázt gyenge vagy közepes tisztítási hatásokkal szolgáltatják, és megfelelően tiszta termék csak bonyolult /9-12 tisztítási lépésből álló/ műveletsorral állítható elő.

A találmány értelmében az ismert módszerek e hátrányait kiküszöbölve olyan eljárást kívánunk biztosítani aminoaciláz elkülönítésére, amely kisszámú, egyszerűen végrehajtható műveleti lépést igényel, és nagy fajlagos aktivitású terméket szolgáltat.

Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy ha a sertésvese vizes extraktumát hőkezeljük, centrifugáljuk, a felülusztó valamint egyértékű kation szervetlen savval képezett sójával telítjük, a kapott szuszpenzióból elkülönítjük a csapadékot, majd a csapadék vizes oldatát vízzel szemben dializáljuk, és az így

képződött oldatból elkülönítjük a terméket, körülbelül 3000-3600 egység/mg fajlagos aktivitású enzimporhoz jutunk, amely további tisztítás nélkül közvetlenül felhasználható immobilizált aminoaciláz előállítására. Abban az esetben, ha az így kapott enzimport kétlépéses kromatográfiás tisztításnak vetjük alá, körülbelül 15 000 egység/mg fajlagos aktivitású enzimkészítményhez jutunk. Ezzel az eljárással tehát, amely mindössze három elkülönítési és két tisztítási műveletből áll, rendkívül tiszta enzimkészítményt állíthatunk elő. Meglepő módon azt tapasztaltuk továbbá, hogy ezzel az eljárással olyan emlősvesékből /például szervasmarha-, ló- vagy nyulveséből/ is kiváló eredménnyel különíthetünk el nagy tisztaságú aminoaciláz, amelyek az enzimet lényegesen kisebb koncentrációban és több balasztanyaggal szennyezve tartalmazzák, mint a sertésvese.

A találmány tárgya tehát javított eljárás aminoaciláz enzim elkülönítésére emlősök veséiből. A találmány értelmében eljárunk el, hogy az önmagában ismert módon előállított vizes emlősvese-extraktumot 5-15 percig 60-80 °C-on hőkezeljük, a hőkezelt elegyet centrifugáljuk, a felüluszóhoz literenként 200-300 g K_XA általános képletű sóat adunk - ahol K egyvegyértékű

kationt jelent, A valamely szervetlen sav anionját jelenti, és x egyenlő az anion vegyértékével -, a kapott szuszpenziót centrifugáljuk, az elkülönített csapadékot vízben oldjuk és vízzel szemben dializáljuk, majd kívánt esetben a dializált oldatot, illetve az oldatból elkülönített enzim 6,5 és 8,5 közötti pH-értékű pufferoldattal készített oldatát anioncserés kromatográfiának vetjük alá, végül kívánt esetben az anioncserés kromatográfia során kapott aktív frakciókat, illetve az aktív frakciókból K_XA általános képletű sóval végzett kicsapással elkülönített enzim 6,0 és 8,0 közötti pH-értékű pufferoldattal készített oldatát gélkromatográfiának vetjük alá egy olyan géliszűrőn ahol a frakcionálási molekulaszly-tartomány felső határa 70 000-nél nagyobb érték, és a terméket a fent ismertetett módon valamely K_XA általános képletű sóval kicsapjuk az aktív frakciókból.

A találmány szerinti eljárás első műveleti lépésében a vizes emlősvese-extraktumot 5-15 percig 60-80 °C-on /előnyösen 10 percig 70 °C-on/ hőkezeljük. Ezzel a hőkezelési művelettel az elkülönítendő enzimet kísérő fehérjék legnagyobb részét denaturáljuk. A denaturált fehérje nagyfelületű csapadék formájában válik ki a vizes oldatból, és derítő hatása révén az oldatban maradt szennyezőanyagok nagy részét is magával ragadja. Ezzel a ténnyel magyarázható, hogy a találmány szerinti eljárással már az első három elkülönítési művelettel /hőkezelés, kicsapás, dializálás/ megközelíthetjük azt a tisztítási hatásfokot, amely a J. Biol. Chem. 194, 455 /1952/ közleményben ismertetett módszer szerint csak hat elkülönítési művelettel érhető el.

A denaturált fehérje elkülönítése után kapott vizes oldatból 200-300 g/l, előnyösen 250-280 g/l, célszerűen 260-270 g/l K_XA általános képletű sóval kicsapjuk a nyers enzimetartalmu

terméket. K_XA általános képletű sóként célszerűen ammóniumsulfátot használunk fel, azonban egyéb sókat, így például nátriumkloridot vagy ammóniumkloridot is alkalmazhatunk. A kivált csapadékot vízben oldjuk, és a vizes oldatot önmagában ismert módon vízzel szemben dializáljuk.

A dializált oldatból kívánt esetben önmagukban ismert módszerekkel, például liofilizálással, porlasztva szárítással vagy

bepárlással elkülöníthetjük az enzimtartalmu terméket. Az így kapott enzimtartalmu termék 37 °C-on mért aktivitása 3000-3600 egység/mg, ami körülbelül 20-25-szörös tisztítási hatásfoknak felel meg. Ez a termék további tisztítás nélkül közvetlenül felhasználható például immobilizált enzimmészitmények előállításához.

Amennyiben a fentiek szerint kapott nyers terméket tovább kívánjuk tisztítani, a szilárd enzimtartalmu anyagot nem szükséges feltétlenül elkülönítenünk a dializált oldatból. A dializált oldatot - adott esetben a pH beállítása után - közvetlenül felvihetjük az anioncserélő oszlopára. Anioncserélő anyagként előnyösen Sephadex kereskedelmi nevű gyantákat, például DEAE-Sephadex A-50-et használhatunk fel. Ha az ioncserés kromatográfia során szilárd enzimtartalmu anyagból indulunk ki, ezt az anyagot pufferoldatban /például 0,05 mólos káliumfoszfát-pufferoldatban /pH = 7,0/ oldva vesszük fel a gyantaoszlopára. A gyantaoszlopot ugyanezzel a pufferoldattal hozzuk egyensúlyba egy előzetes műveletben. A gyantaoszlopot előnyösen nátriumkloridot /célszerűen 0,3 mól nátriumkloridot/ tartalmazó 0,05 mólos káliumfoszfát-pufferoldattal /pH = 7,0/ eluáljuk, eluálószerként azonban más, megfelelő ionerősségű sóoldatot is felhasználhatunk.

Az anioncserélő oszlopot elhagyó aktív frakciókat egyesítjük, majd az aktív frakciókból kívánt esetben a fent ismertetett kicsapásos művelettel elkülönítjük az enzimtartalmu terméket. A kicsapáshoz 1 liter oldatra vonatkoztatva rendszerint 200-300 g, előnyösen 250-280 g, célszerűen 260-270 g K_2A általános képletű só /előnyösen ammóniumszulfátot/ használunk fel. Az elkülönített termék 37 °C-on meghatározott fajlagos aktivitása 6000-6600 egység/mg, ami a kiindulási extraktumhoz viszonyítva körülbelül 40-45-szörös tisztítási hatásfoknak felel meg.

Amennyiben az enzimtartalmu terméket tovább kívánjuk tisztítani, a szilárd enzimtartalmu anyagot nem szükséges feltétlenül elkülönítenünk az anioncserélő oszlopot elhagyó aktív frakcióból, hanem az aktív frakciókat - adott esetben a pH megfelelő beállítása után - közvetlenül felvihetjük a géloszlopára. A gélkromatográfias művelethez előnyösen Sephadex kereskedelmi nevű géleket, például Sephadex G-200-at használunk fel. E tisztítási műveletben csak olyan géleket alkalmazhatunk, amelyek frakcionálási molekulásúly-tartományának felső határa 70 000-nél nagyobb érték. Ha a gélkromatográfia során szilárd enzimtartalmu anyagból indulunk ki, ezt az anyagot pufferoldatban /például 0,05 mólos káliumfoszfát-pufferoldatban /pH = 7,0/ oldva vesszük fel a géloszlopára. A géloszlopot előzetesen ugyanezzel a pufferoldattal egyensúlyba hozzuk. A géloszlopot célszerűen 0,05 mólos káliumfoszfát-pufferoldattal /pH = 7,0/ eluáljuk, eluálószerként azonban más hig pufferoldatokat is felhasználhatunk. A géloszlopot elhagyó aktív frakciókat egyesítjük, majd az aktív frakciókból a korábbiakban ismertetett kicsapásos módszerrel elkülönítjük az enzimtartalmu terméket. A kicsapáshoz 1 liter oldatra vonatkoztatva rendszerint 200-300 g, előnyösen 250-280 g, célszerűen 260-270 g K_2A általános képletű só /előnyösen ammóniumszulfátot/ használunk fel. Az elkülönített termék 37 °C-on meghatározott fajlagos aktivitása 15 000 egység/mg körüli érték, a termék tisztasági foka tehát kiváló.

A találmány szerinti eljárást az oltalmi kör korlátozása nélkül az alábbi példákban részletesen ismertetjük.

1. példa

1 kg tisztított sertésvesét felapritottunk, majd 2 l hideg $+4^{\circ}\text{C}$ -os/ desztillált vízzel homogenizáltuk. A homogenizátumot 1 óra hosszat jeges vízfürdőben kevertettük, majd centrifugáltuk. A felüluszót 60°C -ra melegítettük fel, és 15 percig ezen a hőmérsékleten tartottuk, majd jeges vízfürdőben lehűtöttük és centrifugáltuk. A felüluszóhoz 280 g ammóniumsulfátot adtunk. Egy éjszakai állás után a szuszpenziót centrifugáltuk. A csapadékot kevés hideg $+4^{\circ}\text{C}$ -os/ desztillált vízben feloldottuk, és desztillált vízzel szemben sómentesre dializáltuk. Dialízis után az oldatot szűrtük, majd liofilizáltuk. Kitermelés: 4,2 g aminoaciláz. Aktivitás: 1000 μmol N-acetil-L-metionin hidrolizise/óra/mg fehérje.

2. példa

1 kg tisztított sertésvesét felapritottunk, majd 2 liter hideg $+4^{\circ}\text{C}$ -os/ desztillált vízzel homogenizáltuk. A homogenizátumot 1 óra hosszat jeges vízfürdőben kevertettük, majd centrifugáltuk. A felüluszót 80°C -ra melegítettük fel és 5 percig ezen a hőmérsékleten tartottuk, majd jeges vízfürdőben lehűtöttük és centrifugáltuk. A felüluszóhoz 359 g ammóniumsulfátot adtunk. Egy éjszakai állás után a szuszpenziót centrifugáltuk. A csapadékot kevés hideg $+4^{\circ}\text{C}$ -os/ desztillált vízben feloldottuk, és desztillált vízzel szemben sómentesre dializáltuk. Dialízis után az oldatot szűrtük, majd liofilizáltuk. Kitermelés: 1,1 g aminoaciláz. Aktivitás: 800 μmol N-acetil-L-metionin hidrolizise/óra/mg fehérje.

3. példa

8 kg tisztított sertésvesét felapritottunk, majd 16 liter hideg $+4^{\circ}\text{C}$ -os/ desztillált vízzel homogenizáltuk. A homogenizátumot 1 óra hosszat jeges vízfürdőben kevertettük, majd centrifugáltuk. A felüluszót 70°C -ra melegítettük fel, és 10 percig ezen a hőmérsékleten tartottuk, majd jeges vízfürdőben lehűtöttük, végül centrifugáltuk. A felüluszóhoz 2554 g ammóniumsulfátot adtunk. Egy éjszakai állás után a szuszpenziót centrifugáltuk. A csapadékot kevés hideg $+4^{\circ}\text{C}$ -os/ desztillált vízben feloldottuk, és desztillált vízzel szemben sómentesre dializáltuk. Dialízis után az oldatot szűrtük, majd liofilizáltuk. Kitermelés: 7,2 g aminoaciláz. Aktivitás: 2735 μmol N-acetil-L-metionin hidrolizise/óra/mg fehérje.

4. példa

3,6 kg tisztított marhavesét felapritottunk, majd 7,2 liter hideg $+4^{\circ}\text{C}$ -os/ desztillált vízzel homogenizáltuk. A homogenizátumot 1 óra hosszat jeges vízfürdőben kevertettük, majd centrifugáltuk. A felüluszót 70°C -ra melegítettük fel és 10 percig ezen a hőmérsékleten tartottuk, majd jeges vízfürdőben lehűtöttük és centrifugáltuk. A felüluszóhoz 1234 g ammóniumsulfátot adtunk. Egy éjszakai állás után a szuszpenziót centrifugáltuk. A csapadékot kevés hideg $+4^{\circ}\text{C}$ -os/ desztillált vízben feloldottuk, és desztillált vízzel szemben sómentesre dializáltuk. Dialízis után az oldatot szűrtük, majd liofilizáltuk. Kitermelés: 3,4 g aminoaciláz. Aktivitás: 791 μmol N-acetil-L-metionin hidrolizise/óra/mg fehérje.

5. példa

2,5 kg tisztított lóvesét felapritottunk, majd 5 liter hideg $+4^{\circ}\text{C}$ -os/ desztillált vízzel homogenizáltuk. A homogenizá-

tumot 1 óra hosszat jeges vízfürdőben kevertettük, majd centrifugáltuk. A felüluszót 70°C -ra melegítettük fel és 10 percig ezen a hőmérsékleten tartottuk, majd jeges vízfürdőben lehűtöttük és centrifugáltuk.

A felüluszóhoz 1200 g ammóniumsulfátot adtunk. Egy éjszakai állás után a szuszpenziót centrifugáltuk. A csapadékot kevés hideg $+4^{\circ}\text{C}$ -os/ desztillált vízben feloldottuk, és desztillált vízzel szemben sómentesre dializáltuk. Dialízis után az oldatot szűrtük, majd liofilizáltuk. Kitermelés: 3,8 g aminoaciláz. Aktivitás: 319 μmol N-acetil-L-metionin hidrolizise/óra/mg fehérje.

6. példa

3 g, a 3. példa szerint elkülönített sertésvese-aminoaciláz 0,05 mólos káliumfoszfát-pufferoldatban $\text{pH} = 7,0$ / oldottunk, és az oldathoz 50 g, előzetesen ugyanezzel a pufferoldattal egyensúlyba hozott DEAE-Sephadex A-50 gyantát adunk. Az így kapott szuszpenziót 3 órán át jeges vízfürdőben kevertettük, majd éjszakán át hűtőszekrényben $+4^{\circ}\text{C}$ -on/ állni hagyjuk. Másnap a gyantát háromszor 1 liter fenti pufferoldattal mostuk, majd újabb 1 liter fenti pufferoldatban felvéve egy 5,3 cm átmérőjű, 55 cm magas oszlopba töltöttük. A gyantaoszlopot 0,3 mól nátriumkloridot tartalmazó 0,05 mólos káliumfoszfát-pufferoldattal $\text{pH} = 7,0$ / eluáltuk 200 ml/óra átfolyási sebességgel. Az effluenst 100 ml-es frakciókba gyűjtöttük. Az enzimaktivitást tartalmazó frakciókat összeöntöttük, és az oldathoz 80 g ammóniumsulfátot adtunk. Kitermelés: 0,7 g aminoaciláz. Aktivitás: 5240 μmol N-acetil-L-metionin hidrolizise/óra/mg fehérje.

7. példa

A 6. példa szerint előállított enzimszuszenzióból 25 ml-t /57 mg fehérje/ centrifugáltunk, és a csapadékot 9 ml 0,05 mólos káliumfoszfát-pufferoldatban $\text{pH} = 7,0$ / oldottuk. Az oldatot egy, előzőleg a fenti pufferoldattal átmosott, 2,4 cm átmérőjű, 43 cm magas Sephadex G-200 oszlopra vittük fel. A géloszlopot a fenti pufferoldattal eluáltuk 60 ml/óra átfolyási sebességgel. Az effluenst 5 ml-es frakciókba gyűjtöttük. Az enzimaktivitást tartalmazó frakciókat összeöntöttük, és az oldathoz 9 g ammóniumsulfátot adtunk. Kitermelés: 25 mg aminoaciláz. Aktivitás: 10 000 μmol N-acetil-L-metionin hidrolizise/óra/mg fehérje.

Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás aminoaciláz enzim elkülönítésére vizes emlősvese extraktumból azzal jellemezve, hogy az extraktumot 5-15 percig $60-80^{\circ}\text{C}$ -on hőkezeljük, a hőkezelt elegyet centrifugáljuk, a felüluszóhoz literenként 200-300 g K_xA általános képletű gót adunk - ahol K egyvegyértékű kationt jelent, A valamely szervetlen sav anionját jelenti, és x egyenlő az anion vegyértékével -, a kapott szuszpenziót centrifugáljuk, az elkülönített csapadékot vízben oldjuk és vízzel szemben dializáljuk, majd kívánt esetben a dializált oldatot, illetve az oldatból elkülönített enzim 6,5 és 8,5 közötti pH-értékű pufferoldattal készített oldatát anioncserés kromatográfiának vetjük alá, végül kívánt esetben az anioncserés kromatográfia során kapott aktiv frakciókat, illetve az aktiv frakciókból K_xA általános képletű sóval a fenti módon végzett kicsapással elkülönített enzim 6,0 és 8,0 közötti pH-értékű pufferoldattal készített oldatát gélkromatog-

ráfiának vetjük alá egy olyan gélszűrőn, ahol a frakcionálási molekulaszúly-tartomány felső határa 70 000-nél nagyobb érték, és a terméket a fent ismertetett módon valamely K_A általános képletű sóval kicsapjuk az aktív frakciókból.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás fogantatosítási módja, azzal jellemezve, hogy a hőkezelést 10 percig 70 C°-on végezzük.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás fogantatosítási módja, azzal jellemezve, hogy K_A általános képletű sóként ammóniumsulfátot használunk fel.

rajz nélkül
