



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

265 540 ✓

(11) (B1)

(13)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 9/28

(22) Prihlášené 10 09 87

(21) PV 6574-87.K

(40) Zverejnené 10 02 89

(45) Vydané 15 12 89

(75)

Autor vynálezu

DOBRÁNSKY TOMÁŠ ing., SOVA OTO MUDr. CSc., KOŠICE, HAAS IMRICH ing.,
POLÍVKA ĽUDOVÍT ing. CSc., TRNAVA

(54) Spôsob izolácie alfa-amylázy z biologických materiálov

(57) Riešenie sa týka nového spôsobu izolácie a čistenia alfa - amylázy v priemyselnej výrobe z biologických materiálov. Je založené na využívaní existencie izoelektrického bodu tohoto enzýmu, kde sa autofokusáciou pôsobením jednosmerného prúdu pri napätí 200 až 1 000 V vydeluje zo zmesi enzýmov a bielkovín v roztoku o vodivosti 100 až 800 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ pri pH 5,82 až 6,12. Táto frakcia sa podrobí deliacej technike využívajúcej rozdielne molekulové hmotnosti, s výhodou gélovej chromatografii. Opakovaním alebo zamieňaním oboch techník možno dosiahnuť superčistý enzým potrebný hlavne v priemyselnej výrobe.

Vynález sa týka spôsobu izolácie a čistenia enzýmu alfa - amylázy (EC 3.2.1.1.) v priemyselnej výrobe, ktorý využíva existenciu izoelektrického bodu tohoto enzýmu ako kritéria jeho čistoty.

Podľa doterajších postupov sa alfa - amyláza vyrábala niekoľkými pochodmi, zahrňujúcimi zrážanie síranom amónnym, etanolom, acetónom, ďalej rôznymi systémami gélovej a iontomeničovej chromatografie či elektroforézou v rozličných usporiadaniach. Ich spoločnou nevýhodou bola prácnosť, náročnosť na technické vybavenie pričom dosiahnutiu vyššej čistoty bránila tá skutočnosť, že v konečnom štádiu izolácie bola zmes bielkovín približne rovnakej molekulovej hmotnosti, kde podstatnú časť tvoril enzým, ale obsah prímies 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 samostatného izoelektrického fokusovania pôsobením jednosmerného prúdu v rovnomernom roztoku delenej látky, ktorý je mechanicky stabilizovaný, ako aj jednoduché zariadenie na uskutočňovanie spôsobu.

Vyššie opísané nedostatky izolácie a čistenia enzýmu v podstatnej miere odstraňuje vynález, ktorého podstata spočíva v tom, že dialýzou, alebo ultrafiltráciou sa upraví vodivosť roztoku biologického materiálu obsahujúceho alfa - amylázovú aktivitu na hodnoty 100 až 800 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ a obsah bielkovín sa upraví na 1 až 30 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$, roztok sa autofokusuje jednosmerným elektrickým prúdom pri napätí 200 až 1 000 V, roztok tvoriaci frakciu s najvyššou enzymatickou aktivitou, s výhodou pri pH 5,82 až 6,18 sa izoluje a podrobí deliacej technike využívajúcej 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 alfa - amylázy v technologickom meradle pri výrobe tohoto enzýmu pre potreby viacerých odvetví priemyslu.

P r í k l a d 1

Bakteriálna kultúra kmeňa *Bacillus subtilis* sa odstredí a získaný supernatant sa zahustí vo vákuovej odparke. Vodivosť zahusteného supernatantu sa dialýzou alebo ultrafiltráciou upraví na 100 až 800 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ za pridávania McIlvariovho tlmivého roztoku 0,01 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pH 6,0 s obsahom citrátových iónov, ktoré stabilizujú alfa - amylázovú aktivitu. Obsah bielkovín sa upraví na 10 až 30 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ riedením tlmivým roztokom. Takto upraveným roztokom sa naplní autofokusačná aparatura s počtom komôrok 20 a po uzatvorení sa aplikuje jednosmerný elektrický regulovaný prúd o napätí 200 až 1 000 V regulovanom tak, aby súčin prúdu a napätia neprekročil 3 W. Autofokusácia prebieha pri chlade do $+4^\circ\text{C}$. Proces autofokusácie je ukončený, keď pri napätí 1 000 V klesne prúd na nulu. Delená zmes si samočinne vytvára vzostupný gradient pH, pozdĺž ktorého sa jednotlivé frakcie bielkovín formujú do vrcholov podľa svojich izoelektrických bodov. Alfa - amyláza sa nachádza vo frakciách s najvyššou enzymatickou aktivitou, hlavne v komôrkach s pH medzi 5,82 až 6,18 pričom enzymatická aktivita sa stanovuje na základe narastajúcej oxidačnej aktivity enzýmom štiepeného škrobu. Bielkoviny z tohoto rozmedzia sa zjednotia a nanesú na kolónu rozmerov 80x50 cm naplnenú molekulárnym sitom Spheron P-40, ekvilibrovanú McIlvainovým tlmivým roztokom. Chromatografia prebieha pri 4°C pri prietoku 120 ml/h a zhromažďujú sa frakcie po 30 ml. Po ukončení gélovej filtrácie sa vo všetkých frakciách stanoví obsah bielkovín podľa Lawryho a alfa - amylázová aktivita ako bolo opísané vyššie. Gélovou filtráciou sa autofokusáciou izolované bielkoviny rozdelia do štyroch vrcholov, kde čistá alfa - amyláza sa nachádza v treťom vrchole od počiatku zhromažďovania frakcií. Jednotlivé kroky možno opakovať podľa potrebného stupňa čistoty, ktorá je definovaná jednak elektroforeticky prítomnosťou jedinej línie ale tiež mernou aktivitou, ktorá má dosiahnuť aspoň 3 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ podľa medzinárodného hodnotenia. Tak sa dosahuje až 99,99 %-nej čistoty enzýmu.

P r í k l a d 2

Technická alfa - amyláza, ktorá obsahuje priemerne 60 % čistého enzýmu sa rozpustí v destilovanej vode tak, aby obsah bielkovín bol 10 až 30 g.l⁻¹. Potom sa roztok podrobí ultrafiltrácii v takom usporiadaní (napr. systém AMICON) aby sa z neho eliminovali všetky molekuly s molekulovou hmotnosťou do 40 000. Výsledný roztok je zbavený solí a podstatnej časti bielkovín a ako taký sa aplikuje do autofokusačnej aparatury a delí ako bolo opísané v príklade č. 1. Po zjednotení aktívnych frakcií sa získaný roztok alfa - amylázy znova podrobí ultrafiltrácii ale tak, aby sa eliminovali všetky molekuly s molekulovou hmotnosťou pod 60 000. Vo filtráte sa nachádza alfa - amyláza, ktorej molekulová hmotnosť je okolo 54 až 56 000. Filtrát sa aplikuje do autofokusačnej aparatury menšieho obsahu a znova sa fokusuje v podmienkach opísaných v príklade č. 1. Po ukončení fokusácie sa v komôrkach s pH medzi 5,82 až 6,18 nachádza superčistá alfa - amyláza, ktorá zodpovedá vyššie uvedeným kritériám čistoty.

Okrem uvedených deliacich techník využívajúcich rozdielnu molekulovú hmotnosť delených látok, možno autofokusáciu kombinovať tiež s elektroforézou alebo s vysolovaním.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob izolácie alfa - amylázy z biologických materiálov, vyznačujúci sa tým, že sa dialýzou, alebo ultrafiltráciou upraví vodivosť roztoku biologického materiálu na 100 až 800 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ a obsah bielkovín sa upraví na 1 až 30 g.l⁻¹ a roztok sa autofokusuje jednosmerným elektrickým prúdom pri napätí 200 až 1 000 V, pokiaľ prúd neklesne na nulu a roztok tvoriaci frakciu s najvyššou enzymatickou aktivitou, s výhodou pri pH 5,82 až 6,18 sa izoluje a podrobí deliacej technike využívajúcej rozdielnu molekulovú hmotnosť delených látok, s výhodou gélovú chromatografiu, pričom v závislosti na požadovanej čistote sa jedna alebo obe deliace techniky opakujú aspoň jedenkrát.