



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

218 890

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 08 06 79
(21) (PV 4023-79)
(89) 142 272, DD
(32)(31)(33) Právo přednosti od 03 07 78
(WF C 12 D/206 471) DD

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/50

(40) Zveřejněno 30 07 82
(45) Vydáno 01 07 84

(75)
Autor vynálezu

KÜHN MANFRED dr.,
MOHR PETER prof.dr.,
ČOUPEK JIŘÍ dr.,
NEUMANN BARBARA,

BERLÍN,
HOHEN-NEUENDORF (DD)
PRAHA (ČSSR)
BERLÍN (DD)

(54)

Způsob izolace neutrálních proteáz

Vynález se týká chromatografické izolace neutrálních proteáz obsahujících zinek použitím nových nerozpustných nosičů.

Proteázy oddělené těmito nosiči se používají v oblasti lékařství, v potravinářském průmyslu a v průmyslu nápojů. Izolace se provádí tak, že se slabě zásadité roztoky obsahující neutrální proteázy, uvádějí do styku s heterocyklickými nosiči, přičemž heterocykly obsahují nejméně jeden endocyklický terciární dusíkový atom s volným elektronovým párem. Za účelem oddělení jiných proteinů se provádí eluce tlumivými roztoky vyšší iontové síly a ve slabě alkalickém prostředí a neutrální zinek obsahující proteázy se eluují ve slabě kyselém prostředí. Dialýza se provádí pomocí 0,1 % roztoku octanu vápenatého.

218 890

СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ НЕЙТРАЛЬНЫХ ПРОТЕАЗ

О п и с а н и е

Область применения изобретения

Изобретение относится к хроматографическому способу выделения нейтральных цинкосодержащих протеаз при использовании нерастворимых носителей. Выделенные с помощью этих носителей нейтральные цинкосодержащие протеазы могут применяться в медицине, промышленности пищевых продуктов и напитков.

Характеристика известных технических решений

Протеазы, которые проявляют свою максимальную активность при pH-значении около 7 и для активности которых существенно содержание цинка, причисляются к нейтральным протеазам. Если в дальнейшей части этого описания говорится о нейтральных протеазах, то под ними подразумеваются, таким образом, только эти, цинкосодержащие, подавляемые образующими металлические хелаты агентами, как ЕДТА или о-фенантролин нейтральные протеазы.

Они вырабатываются различными микроорганизмами и в состоянии разрушать гидролитически более высокомолекулярные пептиды и протеины, при физиологических условиях, до более низкомолекулярных частей. Их выделение и получение в чистом виде поэтому имеет значение повсюду там, где важно расщепление протеинов при этих условиях, следовательно, в промышленности пивоварения и дубильной промышленности, при изготовлении сыров, при разложении (отделении) животных тканей, в случае суспензионной культуры клеток и при гигиене зубов. Эти области применения требуют, однако, отчасти получения в чистом виде этих нейтральных протеаз, так как по различным причинам, как слишком незначительная активность,

токсикологическая опасность, высокое содержание чужеродных протеинов, не могут применяться культуральные жидкости микробного происхождения с нейтральной протеазной активностью.

До сих пор для выделения и получения в чистом виде вырабатываемых микроорганизмами нейтральных протеаз прежде всего привлекались реакции осаждения, например, с помощью органических растворителей, как ацетон, спирт, или неорганических солей, как сульфат аммония. Эти методы, однако, имеют тот недостаток, что таким образом полученные нейтральные протеазы всегда содержат еще более или менее большие количества инородных протеинов, которые осаждаются вместе с нейтральными протеазами. По этой причине эти смеси ферментов тогда обладают также только более незначительной удельной (специфической) активностью, чем чистые ферменты, и из-за доли инородных протеинов способствуют протеканию нежелательных побочных реакций.

Из литературы известны хроматографические методы, которые не содержат вышеописанных недостатков и которые приводят к чистым нейтральным протеазным продуктам. В качестве носителей при этом используются биоорганические ионообменники на основе целлюлозы, например, DEAE- или CM-целлюлоза, соответственно, неорганические носители, как гидроксипатит. Несмотря на известный прогресс, однако, также эти материалы носителей и применяемые методы обладают недостатками, которые ограничивают их всеобщую применимость. Это связано, с одной стороны, с самими используемыми материалами носителей и, с другой стороны, с используемыми для получения этих нейтральных протеаз исходными материалами. Служащие в качестве исходных материалов культуральные жидкости микроорганизмов в качестве основных ферментов содержат амилазы, глюканазы, ксиланазы, щелочные протеазы и другие в большом избытке, а нейтральные протеазы всегда только в очень незначительных количествах. (Мощность) Емкость ионообменных носителей в этом случае для нейтральных протеаз только очень незначительная, так как при применении этих носителей связываются также имеющиеся в избытке ферменты. Вследствие этого необходимо перед собственно хроматографическим выделением и очисткой осуществлять также реакцию осаждения, чтобы снизить концентрацию основных ферментов. При применении гидроксипатита в качестве носителя также необходимы предварительные осаждения, чтобы полностью

218 890

удалить α -амилазу. С помощью этого носителя невозможно отделить друг от друга α -амилазу и нейтральные протеазы.

В настоящее время, следовательно, хроматографические методы выделения и очистки нейтральных протеаз еще очень дорогостоящи и неэкономичны, что ведет к тому, что эти протеазы недоступны в достаточных количествах с достаточно большими активностями.

Другие причины, которые говорят против использования биологических и неорганических носителей для выделения и получения в чистом виде нейтральных протеаз из биологического материала, как культуральные жидкости или ферментационные бульоны бактериального происхождения, общеизвестны. Биологические носители микробно неустойчивы и разрушаются составными частями смесей ферментов из бактериальных источников, так что они непригодны для технического использования. Неорганические носители, по причине низкой концентрации активных центров на поверхности, обладают только малой емкостью (мощностью) для связывания биоспецифических эффекторных органов благодаря полимераналогичным превращениям, так что, например, с их помощью аффинную хроматографию нельзя осуществлять эффективно.

Цель изобретения

Целью изобретения является разработка всеобщеприменимого, простого и легко осуществляемого аффиннохроматографического способа выделения и получения в чистом виде нейтральных протеаз, который лишен недостатков до сих пор применяемых методов. Выделение должно осуществляться благодаря макропористым синтетическим сополимерам из оксиалкилметакрилатов (C_2-C_6 -алкил) с выбранными средствами сшивки из групп дивиниловых или поливиниловых мономеров метакрилового типа.

Изложение существа изобретения

Согласно изобретению, содержащий нейтральные протеазы биологический материал, например, культуральные жидкости или растворенные сухие продукты культуральных жидкостей, вводятся в контакт, по колоночному или *Batch* -способу ("порционному" способу), с нерастворимыми носителями, которые содержат ковалентно связанные гетероциклы по меньшей мере с одним эндоциклическим третичным атомом азота со свободной электронной парой.

Содержащий нейтральные протеазы биологический материал представляет собой предпочтительно полученные из бактериальных источников, не содержащие клеток растворы, как культуральные жидкости фермента-ционных бульонов или растворы сухих продуктов этих ферментационных бульонов или частично очищенные растворы, которые получают известными способами очистки, как это описано выше.

Можно исходить из любых бактериальных источников, которые содержат нейтральные протеазы. Особенно предпочтительные ферментационные бульоны или растворенные сухие продукты ферментационных бульонов таких видов бацилл, как *B. amylobliquefaciens*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, *B. subtilis*, *B. thermoproteolyticus*, *B. thuringiensis* и *B. pumylis*, которые могут получаться путем микробной ферментации известными ферментационными способами.

Исходные растворы для связывания нейтральных протеаз должны иметь pH-значение 7-10, предпочтительно 8,5-9,5, что легко достигается известными способами. Способ связывания указанных протеаз можно осуществлять по колоночному или *Batch* -способу. Как в случае колоночного, так и также в случае *Batch* -способа применяется простой процесс промывки для полного удаления чужеродных (инородных) протеинов с помощью буферных растворов более высокой ионной силы и с pH-значением 8,5-9,5, при известных условиях при добавке незначительных количеств растворимого крахмала. Затем связанные с содержащими гетероциклы адсорбентами нейтральные протеазы элюируют буферными растворами с pH-значениями 4-7, при известных условиях при добавке неорганических солей для повышения ионной силы. После элюирования нейтральных протеаз элюаты можно диализовать по отношению к 0,01%-ным растворам ацетата кальция и затем лиофилизировать, причем получают нейтральные протеазы в твердой форме, или растворы можно использовать сразу далее без дальнейшей обработки.

Для приготовления указанных, содержащих гетероциклы носителей, которые используются для этого аффиннохроматографического принципа выделения и очистки нейтральных протеаз, можно привлекать многие известные из органической химии и химии полимеров реакции сочетания при применении самых различных носителей. Для этой цели, например, биоорганические носители на основе цел-

люлозы, полидекстранов и арагозы, или органические синтетические полимеры типа акриловой кислоты, метакриловой кислоты и стирола, соответственно, неорганические носители, как пористое стекло, силикагель и окись алюминия, после их активации, можно вводить во взаимодействие с азотсодержащими гетероциклами, которые содержат экзо- и/или эндоциклические нуклеофильные группы.

Сополимеры из оксиалкилметакрилатов (C_2-C_6 -алкил) с выбранными средствами сшивки из групп дивиниловых или поливиниловых мономеров метакрилатного типа, однако, особенно хорошо пригодны для полимераналогичных превращений с этими гетероциклами. Высокое содержание в них нейтральных гидроксильных групп и их гидролитическая стабильность позволяют осуществлять простые и самые разнообразные модификации полимерных поверхностей, как в органических, так и также в водных растворителях при сильно кислых или щелочных реакционных условиях.

Синтез используемых для аффинной хроматографии сополимеров оксиалкилметакрилатов с ковалентно связанными гетероциклами, которые должны иметь по меньшей мере один эндоциклический третичный атом азота со свободной электронной парой, прост и осуществляется согласно экономическому патенту ГДР С 08 L/205 I74/. В качестве гетероциклов указанного типа принимают во внимание предпочтительно имидазол, бензимидазол или их производные, а также производные пиридина, и таким образом синтезированные, содержащие гетероциклы полимеры обладают высокой специфической способностью связывать нейтральные, цинксодержащие протеазы. Они лишены недостатков известных и в настоящее время используемых материалов для хроматографии. На основании их химической и микробной стабильности их можно повторно использовать после регенерирования. Работа при различных рН-значениях и при разных ионных силах не приводит ни к каким нежелательным изменениям объема носителя. Выделенные нейтральные протеазы вследствие гидрофильных свойств используемых и модифицированных сополимеров из оксиалкилметакрилатов не денатурируются и не инактивируются, как часто наблюдается в случае гидрофобных носителей. Вместе с этими преимуществами новых, содержащих гетероциклы макропористых сополимеров, простая осуществимость и технологическая решаемость способа, а также легкая доступность всех материалов как для приготовления носителей, так и также для получения фермента

дают рентабельный способ выделения и получения в чистом виде нейтральных цинксодержащих протеаз.

Следующие примеры поясняют изобретение, не ограничивая объема изобретения.

Пример 1

50 мл Макропористого сополимера из 2-оксиэтилметакрилат-СО-этилендиметакрилата ($M_{wlim} = 300\ 000$ дальтонов) с содержанием имидазола 6I мг/г носителя (0,9 ммоль) (получен согласно патенту ГДР С 084/205 I74) уравнивают с помощью 0,01 М боратного буфера до pH-значения 9,0 и смешивают с 500 мл культуральной жидкости *Bacillus pumilus*, которая благодаря добавке 1н раствора едкого натра при температуре камеры холодильника доведена до pH-значения 9. Суспензию перемешивают в течение 8 часов в камере холодильника, и затем носителем заполняют колонку, где он промывается с помощью 0,1 М боратного буфера с pH-значением 9,0 до тех пор, пока более не будет элюироваться никаких сопутствующих протеинов. Путем элюирования с помощью 0,1%-ного раствора ацетата кальция с pH=6,5 в 1-молярном хлористом натрии и который содержит 0,5 г сульфата цинка на 1 литр раствора ацетата кальция, нейтральную протеазу отделяют от адсорбента. Выделяющиеся при этом фракции не содержат никаких измеримых активностей сопутствующих ферментов и подавляются EDTA и о-фенантролином. Эти фракции объединяют, диализуют 24 часа по отношению к 4х2 л 0,01%-ного раствора ацетата кальция с pH=6,5, концентрируют путем ультрафильтрации и лиофилизируют. Выход составляет 6 мг протеина с 18-кратным увеличением удельной активности по отношению к исходной культуральной жидкости.

Пример 2

30 г Нейтразы (продажный продукт фирмы Ново-Денмарк) растворяют в 300 мл содержащего 0,5 г растворимого крахмала 0,01 М боратного буфера с pH-значением 9 и перемешивают в течение 30 минут в камере холодильника. Затем суспензию центрифугируют в течение 30 минут при 15 000 оборотов в минуту. Надосадочную жидкость диализуют в течение 24-х часов по отношению к тому же самому боратному буферу и затем вносят в колонку, заполненную 50 мл используемого также в примере 1 имидазолсодержащего носителя. После впитывания (погружения) раствора носитель промывают содержащим крахмал 0,1 М боратым буфером с pH-значением 9,0,

218 890

чтобы полностью элюировать сопутствующие протеины. Затем с адсорбента выделяют нейтральную протеазу с помощью 0,1%-ного раствора ацетата кальция с pH-значением 6,5, в 1-молярном растворе хлористого натрия, и который содержит 0,5 г сульфата цинка на литр раствора ацетата кальция. Эти фракции не содержат никаких измеримых активностей щелочной протеазы, α -амилазы, β -глюконазы, и подавляются EDTA и о-фенантролином. Их очищают диализом в течение 24-х часов по отношению к 4х2 л 0,01%-ного раствора ацетата кальция с pH = 6,5, концентрируют путем ультрафильтрации и лиофилизируют. Выход составляет 10 мг протеина с 11-кратным увеличением удельной активности по сравнению с исходным продуктом.

Пример 3

К 1 000 мл концентрированной культуральной жидкости *Bacillus subtilis* при перемешивании и при температуре холодильной камеры медленно прикапывают один литр холодного ацетона. После добавки 20 г твердого ацетата кальция образовавшуюся суспензию перемешивают еще 30 минут при температуре холодильной камеры (камеры холодильника). Осадок затем отцентрифугируют и к надосадочной жидкости при прочих равных условиях, однако, без добавки ацетата кальция, прикапывают дальнейший литр ацетона. После декантации надосадочной жидкости остающийся осадок растворяют в 250 мл 0,01 М боратного буфера с pH-значением 9, в котором растворено 0,5 г крахмала. К этому раствору фермента добавляют 50 мл такого же, обработанного предварительно согласно примеру 1, имидазолсодержащего носителя, и суспензию перемешивают в течение 8 часов в камере холодильника. Носитель отделяют от раствора на фритте и промывают содержащим крахмал 0,1 М боратым буфером с pH-значением 9, чтобы отделить сопутствующие протеины. Нейтральную протеазу отделяют от адсорбента при таких же условиях, что и описанные в вышеприведенных примерах. Раствор фермента диализуют в течение 24-х часов по отношению к 4х2 л 0,01%-ного раствора ацетата кальция, концентрируют путем ультрафильтрации и лиофилизируют. Выход составляет 28 мг протеина с 8-кратным увеличением удельной активности по сравнению с исходной культуральной жидкостью.

Пример 4

20 мл Макропористого сополимера из 2-оксиэтилметакрилат-

-CO-этилендиметакрилата ($M_{wLim} = 300\ 000$ дальтонов) с содержанием пиридина 78 мг (0,57 ммоль/г носителя) (получен согласно экономическому патенту ГДР С 08 L /205 I74) суспендируют в 0,01 М боратном буфере с рН-значением 9,0, заполняют им колонку и уравнивают таким же боратым буфером. В эту колонку вносят 50 мл раствора фермента, который получен из концентрированной культуральной жидкости *Bacillus subtilis*, как описано в примере 3. После поглощения ("погружения") раствора носитель промывают 0,1 М боратым буфером в 0,5 М хлористом натрии с рН-значением 9,0 вплоть до полного элюирования сопутствующих протеинов. Затем нейтральную протеазу элюируют как описано в примерах 1-3. Фракции не содержат никаких измеримых активностей сопутствующих ферментов и подавляются EDTA и о-фенаantroлином. Их объединяют, диализуют в течение 24-х часов против 4x2 л 0,01%-ного раствора ацетата кальция с рН = 6,5, концентрируют путем ультрацентрифугирования и лиофилизируют. Выход составляет 1,2 мг протеина с 16-кратным увеличением удельной активности по сравнению с исходной культуральной жидкостью.

1. Способ выделения нейтральных, цинксодержащих протеаз, отличающийся тем, что содержащие нейтральные протеазы растворы с pH-значением 7-10, предпочтительно 8,5-9,5, по колоночному или *Batch* ("порционному") - способу вводят в контакт с содержащими гетероциклы носителями, причем гетероциклы должны содержать по меньшей мере один эндоциклический, третичный атом азота со свободной электронной парой, вымывают чужеродные протеины с помощью буферных растворов более высокой ионной силы и pH-значением 8,5-9,5 и связанные с содержащими гетероциклы носителями нейтральные цинксодержащие протеазы элюируют с помощью буферных растворов с pH-значением 4-7, при известных условиях при добавке неорганических солей, диализуют против 0,01%-ного раствора ацетата кальция и лиофилизируют.

2. Способ выделения по п.1, отличающийся тем, что в качестве содержащего нейтральные цинксодержащие протеазы биологического материала используются бактериальные источники, в особенности культуральные жидкости ферментационных бульонов или растворы сухих продуктов этих ферментационных бульонов или отчасти очищенные растворы.

3. Способ по п.п.1 и 2, отличающийся тем, что используются ферментационные бульоны или растворенные сухие продукты ферментационных бульонов вида бацилл, как *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. thermoproteolyticus*, *B. thuringiensis* и *B. pumilis*, которые получают путем микробной ферментации по известным ферментационным способам.

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что в

качестве содержащих гетероциклы носителей используются сополимеры оксиалкилметакрилатов (C_2-C_6 -алкил) с выбранными средствами сшивки из групп дивинил- или поливинил-мономеров метакрилатного типа.

5. Способ по п.п. I и 4, отличающийся тем, что в качестве содержащих гетероциклы носителей применяются сополимеры, которые содержат 5-, 6-членные или содержащие большее количество членов гетероциклы, предпочтительно имидазол, бензимидазол и их производные, а также производные пиридина.

СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ НЕЙТРАЛЬНЫХ ПРОТЕАЗА н н о т а ц и я

Изобретение относится к хроматографическому способу выделения нейтральных цинксодержащих протеаз при применении новых нерастворимых носителей. Выделенные с помощью этих носителей протеазы используются в области медицины, в промышленности пищевых продуктов и напитков. При этом слабо основные растворы, содержащие нейтральные протеазы, вводят в контакт с гетероциклическими носителями, причем гетероциклы содержат по меньшей мере один эндоциклический третичный атом азота со свободной электронной парой. Для отделения чужеродные протеины элюируют с помощью буферных растворов более высокой ионной силы и в слабощелочной области и нейтральные цинксодержащие протеазы элюируют в слабокислой области. Диализ осуществляют с помощью 0,01%-ного раствора ацетата кальция.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob izolace neutrálních proteáz obsahujících zinek, vyznačující se tím, že roztoky o pH 7 až 10, výhodně 8,5 až 9,5, obsahující neutrální proteázy, se uvádějí ve styk s nosiči obsahujícími heterocykly, buď sloupcovým nebo vsázkovým způsobem, přičemž heterocykly musí obsahovat alespoň jeden endocyklický, terciární atom dusíku s volným elektronovým párem, ostatní proteiny se vymyjí roztoky pufrů vyšší iontové síly o pH 8,5 až 9,5 a proteázy obsahující zinek, vázané na nosičích obsahujících heterocykly se eluují tlumivým roztokem o pH 4 až 7 za přídavku anorganických solí, dialyzují se 0,01 % roztokem octanu vápenatého a lyofilizují se.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako biologický materiál obsahující neutrální proteázy obsahující zinek, používá materiál bakteriálního původu, zejména kultivační kapaliny fermentačních médií nebo roztoky suchých produktů těchto enzymů nebo částečně vyčištěné roztoky.
3. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že se používají fermentační média bakterií jako je *B. amylo-liquefaciens*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. thermoproteolyticus*, *B. thuringiensis* a *B. pumylis*, které se získají mikrobiální fermentací.
4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako nosiče obsahující heterocykly používají kopolymery hydroxyalkylmetakrylátů (C_2-C_6 -alkyl) se zesíťovacími prostředky vybranými ze skupiny divinyl-nebo polyvinylmonomerů metakrylátového typu.
5. Způsob podle bodů 1 a 4, vyznačující se tím, že se jako nosiče obsahující heterocykly používají kopolymery, které obsahují 5-, 6- nebo vícečlenné heterocykly, výhodně imidazol, benzimidazol a jejich deriváty a také deriváty pyridinu.

Uznáno vynálezem na základě výsledků expertizy, provedené Úřadem pro vynálezeectví a patentnictví, Berlín, DD.