

ČESKOSLOVENSKÁ  
SOCIALISTICKÁ  
REPUBLIKA  
(19)



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY  
A OBJEVY

# POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

## 246696

(11) (B1)

(51) Int. Cl.<sup>4</sup>

C 12 N 9/48

(22) Přihlášeno 21 06 85

(21) PV 4583-85

(40) Zveřejněno 13 03 86

(45) Vydáno 15 10 87

(75)

Autor vynálezu

ŠAFARÍK IVO ing. CSc., PRAHA

### (54) Způsob izolace proteolytických enzymů

Izolace se provádí adsorbací proteolytických enzymů na částice obilné slámy. Eluce proteinas se provádí roztoky anorganických solí, např. chloridy a sírany sodným, draselným nebo amonným.

Vynález se týká způsobu izolace proteolytických enzymů.

Proteolytické enzymy se v současné době izolují celou řadou metod, jako je např. srážení síranem amonným nebo síranem sodným, srážení vychlazenými organickými rozpouštědly (aceton, etanol), ionexová chromatografie, gelová chromatografie, afinitní chromatografie nebo ultrafiltrace. Pouze za pomoci afinitní chromatografie je možno získat značně přečištěný preparát proteinas v jediném izolačním stupni.

Typické sorbenty pro afinitní chromatografii proteinas se připravují imobilizací vhodných ligandů (substrát, inhibitor, protilátka) na nerozpustný nosič. Jako typické příklady je možno uvést izolaci pankreatického trypsinu na ovomukoid-Spheronu (Turková, J., Seifertová, A.: J. Chromatogr. 148, 293 /1978/), izolaci proteinas z mouky ze sladované pšenice na sloupci hemoglobin-Sepharosy (Chua, G. K., Bushuk, W.: Biochim. Biophys. Res. Commun. 37, 545 /1969/) nebo izolaci pepsinu na sloupci polylysin-Sepharosy 4B (Nevaldine, B., Kessel, B.: Biochim. Biophys. Acta 250, 207 /1971/).

Při přípravě sorbentů pro afinitní chromatografii je často nutno použít několikastupňový proces pro aktivaci nosiče, jsou vyžadovány speciální chemikálie apod.

Způsob izolace proteolytických enzymů z komplexních směsí podle vynálezu spočívá v tom, že se proteinasy obsažené v roztoku adsorbují na částice obilné slámy. Jejich eluce se provádí roztoky anorganických solí, s výjimkou solí ovlivňujících enzymovou aktivitu, s výhodou sírany a chloridy sodnými, draselnými a amonnými. Výhodou tohoto způsobu je použití velmi dostupné suroviny a rovněž to, že slámu je možno pro izolaci proteolytických enzymů připravit velmi jednoduchým způsobem.

Vynález je dokumentován příklady použití.

#### Příprava sorbentu

Obilná sláma byla namleta nebo nastříhána na malé částice. Částice slámy byly povařeny v 1-10% roztoku hydroxidu sodného nebo draselného po dobu 1-10 hodin. Po povaření byly částice slámy převedeny do kolony, byly důkladně promyty vodou, roztokem chloridu sodného nebo síranu amonného ( $1 \text{ mol.l}^{-1}$ ) a opět vodou, dokud absorbance vodných a solných promyvů při 280 nm a tloušťce vrstvy 1 cm nebyla menší než 0,01.

#### P ř í k l a d 1

Na sloupec částic pšeničné slámy o rozměrech 130x12 mm bylo aplikováno 10 ml modelového roztoku obsahujícího 10 mg trypsinu a 100 mg enzymového hydrolyzátu kaseinu. Balastní bílkoviny byly z kolony vymyty vodou. Adsorbovaný trypsin byl z kolony eluován zvýšením iontové síly prostředí (elucí roztokem chloridu sodného,  $1 \text{ mol.l}^{-1}$ ). Obsah bílkovin byl stanoven Lowryho metodou (Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: J. Biol. Chem. 193, 265 /1951/) a aktivita proteinasy byla stanovena azokaseinovou metodou (Šafařík, I.: J. Chromatogr. 261, 138 /1983/).

Z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami při eluci vodou vymylo 2 % aktivity, při eluci roztokem chloridu sodného se v prvních 110 ml roztoku vymylo 70 % aktivity. Specifická aktivita trypsinu se po chromatografii zvýšila 8,5krát.

#### P ř í k l a d 2

Za analogických podmínek jako v příkladu 1 byla provedena chromatografie 10 mg komerčního preparátu trypsinu, rozpuštěného v 10 ml vody. Z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami vymylo 5 % aktivity, při eluci roztokem chloridu sodného se v celkovém objemu 96 ml vymylo 66 % aktivity. Specifická aktivita trypsinu se po chromatografii zvýšila 2krát.

## P ř í k l a d 3

Na sloupci ječné slámy o rozměrech 105x12 mm byla provedena izolace bakteriálních proteinů produkovaných kmenem *Bacillus sp.*, který byl izolován z půdy. Po aplikaci 10 ml odstředěného kultivačního média byly balastní bílkoviny vymyty vodou a adsorbované proteiny byly vymyty roztokem síranu amonného ( $1 \text{ mol.l}^{-1}$ ). Z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami při eluci vodou vymylo 30 % aktivity, při eluci roztokem soli se v objemu 130 ml vymylo 65 % aktivity. Specifická aktivita proteinů se po chromatografii zvýšila 20krát.

## P ř í k l a d 4

Za analogických podmínek jako v příkladu 1 byla provedena chromatografie kyselého vyčreňeného hovězího pankreatického extraktu. Extrakt byl před aplikací na kolonu 24 h dialyzován proti tekuté vodě a poté nechán 24 h při laboratorní teplotě, aby byla umožněna konverze trypsinogenu a chymotrypsinogenu na aktivní proteiny. Bylo aplikováno 6 ml roztoku, z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami při eluci vodou vymylo 15 % aktivity, při eluci roztokem chloridu sodného ( $1 \text{ mol.l}^{-1}$ ) se v objemu 150 ml vymylo 70 % aktivity. Specifická aktivita proteas se po chromatografii zvýšila 4krát.

## P ř í k l a d 5

Za analogických podmínek jako v příkladu 1 byla provedena chromatografie modelové směsi obsahující trypsin. Jako sorbent byly použity částice pšeničné, ječné, žitné a ovesné slámy. Mezi jednotlivými druhy slámy nebyly výrazné rozdíly.

## P ř í k l a d 6

Za analogických podmínek jako v příkladu 2 byla provedena chromatografie trypsinu. K eluci aktivní proteasy bylo rovněž možno použít roztok chloridu draselného ( $1 \text{ mol.l}^{-1}$ ).

## P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob izolace proteolytických enzymů, vyznačující se tím, že se proteolytické enzymy obsažené v roztoku adsorbují na částice obilné slámy, jejich eluce se provádí roztoky anorganických solí s výjimkou solí, které ovlivňují enzymovou aktivitu, s výhodou síranu a chloridu sodnými, draselnými a amonnými.