



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

237 699

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 25 01 84
(21) PV 543-84

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 9/08

(40) Zveřejněno 14 12 84
(45) Vydáno 01 06 87

(75)
Autor vynálezu

KUNČICKÝ JIŘÍ ing. CSc., CHOCEŇ,
ČERNÝ OTAKAR ing. CSc., PARDUBICE,
FLORIÁN PETR ing., CHRUDIM,
DOFEK RUDOLF RNDr. PhMr. CSc.,
SMRŽ MILOSLAV RNDr., BRNO

(54)

Způsob přípravy peroxidasy

Způsob přípravy peroxidasy z bruk-
ve zelné, kedlubny nebo křenu spočívá v
exhalaci vodou rozmělněné suroviny, při
srážení exhalátu a rafinaci. Rafinace se
provádí tak, že se surový vodný roztok
peroxidasy po přesrážení nechá projít
vrstvou nízkoporézního gelu s vylučovací
mezí v oblasti 1 000 až 30 000. Eluent
se jímá ve frekvencích podle požadované
čistoty a specifické aktivity. Podíl s
nízkou specifickou aktivitou se vrací
do stádia srážení.

Vynález se týká zlepšeného způsobu přípravy peroxidasy z přírodních materiálů, z brukve zelné, (*Brassica oleracea* L., var. *gongylodes* L.), kedlubny Gigant a z křenu (*Armoracia rusticana*). Tento způsob používá k rafinaci gelovou filtrací surového enzymu.

Průmyslově se peroxidasa, enzym katalyzující v živočišných i rostlinných tkáních rozklad peroxidu vodíku, získává výhradně z křenu (např. *Armoracia rusticana*). Obsah tohoto enzymu, který se jinak nachází prakticky ve všech živých organismech, je totiž v převážné většině potenciálních zdrojů natolik nízký, že izolace z těchto surovin by nebyla efektivní. Teprve nedávno bylo nalezeno, že peroxidasu lze izolovat v dobrém výtěžku z brukve zelné, kedlubny, s výhodou nové odrůdy Gigant.

Peroxidasa základní nižší kvality se připravuje několikanásobným srážením vodného extraktu suroviny síranem amonným, nebo vodorozpustnými rozpouštědly, jako je aceton, methanol ethanol a podobně. Získaný produkt se zbavuje zbytků nízkomolekulárních srážedel dialýzou, což je operace poměrně náročná na zařízení, ale především je zdlouhavá, a tedy i zdrojem ztrát aktivity. Roztok po dialýze, tzv. retentát, se podrobuje finálnímu mrazovému sušení lyofilizací. Sleduje-li se při přípravě získání produktu vyšší kvality, rafinuje se dále produkt základní kvality některou z chromatografických metod, tj. iontovýměnnou chromatografií na diethylaminoethylcelulóze nebo karboxymethylcelulóze, nebo gelovou či afinitní chromatografií, obvykle však kombinací alespoň dvou způsobů.

Při zkoumání chování nově izolované peroxidasy z brukve zelné, kedlubny bylo s překvapením zjištěno, že podstatný podíl bílkovinných příměsí, znečišťujících peroxidasu získanou prostým násobným přesrážením extraktu obdrženého vylišováním rozemleté suroviny tvoří

látky poměrně nízkomolekulární, které se oddělují při gelové chromatografii i na takových gelech, které se běžně používají jen k odsolování. Toto zjištění, platné i pro izolaci peroxidasy z křenu, je využito u nově navrženého způsobu přípravy peroxidasy, který je předmětem tohoto vynálezu.

Podle tohoto nového způsobu se postupuje tak, že zdroj peroxidasy, jímž může být např. brukev zelná, kedlubny, nebo křen, se rozmělní a získaná měl se vylisuje. Pevné zbytky se mohou případně nechat nasáknout dalším podílem vody a lisování znovu zopakovat. Spojené filtráty se dále zbaví suspendovaných drobných částic filtrací přes vrstvu křemeliny a peroxidasa se vysráží buď rozpouštěním anorganické soli jako např. síranu amonného, nebo přidáním organického rozpouštědla, jakým je například aceton. Sraženina surové peroxidasy se izoluje v prvním případě nejlépe filtrací přes vrstvu křemeliny, v druhém odstředěním. Dalšího stupně rafinace se dosáhne extrakcí získaného koláče, nebo sedimentu odměřeným množstvím vody a frakčním vysrážením peroxidasy. Frakční srážení se provádí stejnými nebo obdobnými činidly jako první srážení. Roztok peroxidasy, který se získá novou extrakcí filtračního koláče, nebo sedimentu po frakčním srážení se bez jakýchkoliv úprav podrobí gelové chromatografii, nechá se projít vrstvou nízkoporesního gelu s vylučovací mezí v oblasti 1000 až 20 000. Přitom se chromatografovaný materiál rozdělí do několika frakcí podle požadované čistoty a specifické aktivity. Jako první putuje vrstva obsahující globule peroxidasy vázané slabými vazbami k vysokomolekulárním organickým příměšinám. Tuto frakci je výhodné recirkulovat do další násady před srážení, kde lze tyto látky oddělit. Dále následuje vrstva vyčištěné peroxidasy. Izolaci její vhodné úzké frakce lze jako část produkce získávat přímo i peroxidasu špičkové kvality, charakterizovanou hodnotou RZ 3 (Číslo RZ je kritérium vyjádřené poměrem absorbancí vodného roztoku peroxidasy při 403 a 275 nm, kterým se hodnotí přítomnost cizích bílkovin. Absorpce při 403 nm je charakteristická pro ferriprotoporfyrinovou skupinu enzymu, absorpce při 275 nm pro bílkoviny). Do finální formy se získané roztoky převádou mrazovým sušením (lyofilizací). Jako poslední odchází frakce balastních látek, tato frakce

je žlutá, a srážedla. Po vytečení této frakce je kolona připravena k novému použití.

Postup podle tohoto vynálezu je výhodný zejména tím, že zavádí zjednodušený způsob izolace a rafinace, gelovou chromatografií na úzkopórových gelech. Nahrazuje tak zdlouhavou dialýzu a následnou rafinaci jedinou operací, čímž celý proces přípravy peroxidasy významně urychluje a zkvalitňuje zamezením ztrát, vznikajících až doposud při dlouhodobých a opakovaných rafinačních procesech.

Peroxidasa se používá převážně ke zhotovování diagnostických materiálů ve zdravotnictví (důkaz glukosy, cholesterolu). Čisté preparáty (RZ 3) se využívají pro značkování a detekci v histochemii a cytochemii.

Způsob podle vynálezu je blíže popsán v následujících příkladech:

Příklad 1

5 634 g kedluben odrůdy Gigant, které byly 10 dnů dozrávány při laboratorní teplotě, bylo rozmixováno se stejným hmotovým dílem vody v dávkách po 400 g v mixéru ETA 1-012. Získaná měl byla vymačkána v polypropylenové filtrační plachetce, nejdříve po částech v rukách a pak ještě všechna najednou lisováním mezi dvěma deskami 400 x 300 mm stahováním čtyř šroubů M 10 v rozích desek. Bylo tak získáno 8 665 g roztoku o celkové aktivitě 1 330 660 PPG a 1 408 g filtračního koláče se zbytkovou aktivitou 170 000 PPG. (PPG -purpurogallinová jednotka referuje k počtu miligramů purpurogallinu, které se vyloučí katalytickým působením peroxidasy na roztok pyrogallolu a peroxidu vodíku za standardních podmínek definovaných v publikaci J. Davídka: Laboratorní příručka analýzy potravin, SNTL, Praha 1977 na straně 661). Koláč byl vyhozen, filtrát byl ponechán přes noc při teplotě kolem 4 °C a ráno byl zbaven suspendovaných pevných částic filtrací přes 50 g křemeliny, naplavené na filtrační papír na Büchnerově nálevce o průměru 250 mm. Filtrování roztoku bylo napomáháno obnovováním povrchu filtrační plochy stíráním špachtlí. Takto byla filtrace ukončena za dvě hodiny. Aktivita peroxidasy ve filtrátu se nezměnila. K filtrátu pak bylo přidáno 5,5 kg síranu amonného kvality čistý a po rozpuštění a dvou hodinách stání byla suspenze peroxidasy zfiltrována přes 50 g křemeliny stejnou

technikou, jaká je popsána výše. Filtrát vykazoval aktivitu 70 000 PPG, zbytek peroxidasy se z něj nevylučoval ani delším stáním a byl proto zlikvidován. Filtrační koláč byl extrahován 400 a 300 ml vody, vždy tak, že koláč byl vyjmut, 10 minut míchán s určeným množstvím vody při laboratorní teplotě a suspenze byla pak zfiltrována. První extrakce poskytla 430 g roztoku s aktivitou 970 000 PPG a druhá 348 g roztoku o aktivitě 280 000 PPG. Filtráty byly spojeny za míchání a k nim bylo při normální teplotě přidáno 140 g síranu amonného kvality p.a. Po rozpuštění stála směs tři hodiny při teplotě 4 °C a pak byla odstředěna na odstředivce Janotaki T-23 (10 min. při 6 000 l/min.). Sediment měl 95 000 PPG a byl vyhozen. K supernatantu bylo přidáno 40 ml peroxidasy z minulého pokusu, (získaných jako okrajové frakce při gelové chromatografii (viz dále/, o aktivitě 230 000 PPG a 300 g síranu amonného a po rozpuštění síranu byla směs při teplotě 4 °C ponechána do druhého dne. Vzniklá suspenze peroxidasy pak byla zfiltrována přes 10 g křemeliny. Filtrát byl neaktivní a byl vyhozen, filtrační koláč byl extrahován dvakrát čtyřiceti mililitry vody stejnou technikou, jaká je popsána výše, čímž se získalo 97 g filtrátu s peroxidasou o aktivitě 1 300 000 PPG. Roztok peroxidasy pak byl přečištěn chromatografií na koloně o průměru 37 mm a s výškou náplně 460 mm. Kolona byla naplněna gelem s vylučovací mezí 1 500 a 30 000 (Sephader G-50 Fine, výrobce Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Švédsko). Chromatografie byla provedena ve čtyřech násadách s rychlostí toku 4 ml. min.⁻¹. Bylo získáno celkem 129 g hlavního podílu o aktivitě 595 000 PPG a 288 g okrajových frakcí s aktivitou 705 000 PPG. Frakce byly spojovány na základě měření hodnot RZ, které bylo požadováno lepší než 0,75. Lyofilizace hlavního produktu byla provedena ve dvou šaržích při absolutním tlaku 30 P. Bylo získáno 0,33 g produktu o RZ 0,98 a specifické aktivitě 1 200 PPG/mg.

Okrajové frakce z chromatografie na Sephadexu G-50 (288 g) byly nasyceny 180 g síranu amonného a po stání přes noc při teplotě 4 °C byla peroxidasa oddělena filtrací přes 10 g křemeliny. Neaktivní filtrát byl vyhozen, filtrační koláč byl extrahován dvakrát třiceti mililitry vody. 63 g extraktu obsahovalo peroxidasu o aktivitě 700 000 PPG. Chromatografií na Sephadexu G-50 (kolona o průměru 27 mm, výška 290 mm) ve třech dávkách bylo získáno 64 g roztoku o aktivitě 507 000 PPG a 40 g okrajových frakcí o aktivitě 180 000 PPG,

které byly recyklovány pro další pokus. Lyofilizací hlavních frakcí v jedné dávce bylo získáno 0,35 g peroxidasy o RZ = 0,68 a specifické aktivitě 1046 PPG/mg.

Celkem tedy bylo získáno bez ohledu na odlišnost hodnot RZ a malý rozdíl v aktivitě recyklů i specifické aktivitě obou podílů produktu z 5 634 g kedluben 0,68 g peroxidasy o aktivitě 762 000 PPG (57,3 % aktivity původního extraktu), resp. 50,8 % původní aktivity suroviny.

Příklad 2

Pokus popsany v příkladu 1 byl opakován s výchozím množstvím 5 385 g kedlubny odrůdy Gigant. Při první gelové chromatografii byla odebrána úzká frakce o hmotnosti 11 g, která byla lyofilizována zvlášť. Pokus byl dále dokončen tak, jak je popsáno v příkladu 1. Bylo získáno 0,045 g peroxidasy o RZ 3,1 a specifické aktivitě 1 400 PPG/mg, 0,260 g peroxidasy o RZ 0,93 a spec. aktivitě 1 200 PPG/mg a 0,290 g peroxidasy o RZ 0,63 a spec. aktivitě 1 020 PPG/mg.

Příklad 3

Pokus popsany v příkladu 1 byl opakován. Namísto síranu amonného byl však ke srážení používán aceton. Teplota obou kapalin (roztoku peroxidasy a acetonu) byla před míšením snížena na -5°C a během míšení byla směs ještě dále chlazena, aby její teplota nepřestoupila -4°C . K úplnému vysrážení peroxidasy byl brán 1,7 objemový násobek acetonu, k frakčnímu srážení 0,4 násobek. Zpracováním 4 023 g kedluben Gigant bylo získáno 0,25 g peroxidasy o RZ 1,1 a specifické aktivitě 1 300 PPG/mg a 0,21 g peroxidasy o RZ 0,72 a specifické aktivitě 1 050 PPG/mg.

Příklad 4

Pokus popsany v příkladu 1 byl opakován, namísto gelu o vylučovací mezi 1 500 až 30 000 (Sephadex G-50) byl však k chromatografii vzat gel s vylučovací mezí 1 000 až 5 000 (Sephadex G-25). Z 6 030 g kedluben Gigant bylo získáno 0,38 g peroxidasy o RZ 1,05 a specifické aktivitě 1100 PPG/mg.

Příklad 5

237 888

Postup dle příkladu 1 byl opakován, namísto kedluben odrůdy Gigant však bylo ke zpracování vzato 4 895 g křenu selského (*Armoracia rusticana*), který byl před rozmělněním v mixéru dva dny máčen v tekoucí vodě. Roztok získaný trojnásobným vylisováním drti se stejným hmotovým dílem vody obsahoval peroxidasu o celkové aktivitě 1 720 000 PPG a jeho zpracováním podle postupu popsaneho v příkladě 1 bylo získáno 0,495 g peroxidasy o RZ 1,13 a specifické aktivitě 1 736 PPG.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

237 699

Způsob přípravy peroxidasy z brukve zelné, kedlubny, *Brassica oleracea* L., var. *gongylodes* L., s výhodou odrůdy Gigant nebo křenu extrakcí rozmělněné suroviny vodou, přesrážením extraktu a refinací, vyznačený tím, že se surový vodný roztok peroxidasy po přesrážení nechá projít vrstvou nízkoporézního gelu s vylučovací mezí v oblasti 1 000 až 30 000, přičemž z eluentu získaného ve frakcích podle požadované čistoty a specifické aktivity se podíl s nízkou specifickou aktivitou vrací do stádia srážení.