



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

246055
(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 9/78

(22) Přihlášeno 06 04 82
(21) (PV 2463-82)

(40) Zveřejněno 13 02 86

(45) Vydáno 15 12 87

(72)

Autor vynálezu

BOROS LÁSZLÓ dr.; DARÓCZI IVÁN; HUBER IRÉN;
IVONY JÓZSEFNÉ, BUDAPEŠT; KISS JÁNOSNÉ, SZEGED;
SZAJÁNI BÉLA dr., BUDAPEŠT (MLR)

(73)

Majitel patentu

„REANAL“ FINOMVEGYSZERGYÁR, BUDAPEŠT (MLR)

(54) Způsob izolace enzymu aminoacylasy

1

2

Enzym aminoacylasa se izoluje z vodného extraktu ledvin savců tak, že se extrakt zahřívá 5 až 15 minut při 60 až 80 °C. Teplem zpracovaná směs se odstředí. K supernatantu se přidá 200 až 300 g/litr amonné soli, výhodně síranu amonného. Vzniklá suspenze se odstředí, oddělená sraženina se rozpustí ve vodě, roztok se dialysuje proti vodě. Zdialysovaný roztok nebo roztok enzymu izolovaného z dialysátu v pufru o pH 6,5 až 8,5 se popřípadě podrobí chromatografii na anexu. Potom se popřípadě podrobí aktivní frakce získané chromatografií, nebo roztok enzymu vysráženého z aktivních frakcí přidáním amonné soli v pufru o pH 6,0 až 8,0, gelové chromatografii na gelovém filtru, jehož horní hranice frakcionovaných molekulárních hmotností je vyšší než 70 000. Enzym se z aktivních frakcí vysráží amonnou solí.

Surových, přečištěných a čistých pevných enzymových produktů lze používat pro přípravu imobilizované aminoacylasy, která se používá při štěpení DL-aminokyselin.

Vynález se týká zlepšeného způsobu izolace aminoacylasy z ledvin savců, zvláště vepřů.

Je známo, že enzym aminoacylasy se vyskytuje v nejvyšších koncentracích v ledvinách vepřů, a proto se při popsání způsobech izolace aminoacylasy používá jako suroviny těchto ledvin.

Podle metody popsané v časopisu J. Biol. Chem. 178, 503 (1949) se aminoacylasy izoluje z kůry vepřových ledvin následujícím způsobem: vodný extrakt z kůry vepřových ledvin se smísí se 78% ethanolem tak, aby konečná koncentrace ethanolu byla 15%, směs se nechá stát 12 hodin při -6°C , pak se odstředí a množství ethanolu v supernatantu se upraví na obsah 30%. Kapaliny se okyslí na pH 6,3 a směs se nechá stát dalších 12 hodin při -15°C . Vyloučená látka se odcentrifuguje, pH supernatantu se upraví na hodnotu 5,1 a směs se opět nechá stát 12 hodin. Vyloučená sraženina, která obsahuje aminoacylasy, se izoluje odstředěním. Specifická aktivita získaného produktu je asi čtyřnásobně vyšší než aktivita výchozího extraktu, což odpovídá velmi nízkému stupni čištění.

V časopisu J. Biol. Chem. 194, 455 (1952) je pro izolaci aminoacylasy z vodného extraktu vepřových ledvin popsána série operací sestávající ze šesti frakcionačních stupňů a následujícího lyofilizačního stupně. Touto metodou lze připravit žádaný enzym asi ve třicetnásobném stupni čistoty (to je ještě v relativně nízkém stupni), přičemž je tento způsob mnohem pracnější než shora uvedená první metoda. Specifická aktivita lyofilizovaného produktu je pouze 4 640 jednotek/mg.

Aminoacylasy lze izolovat ve velmi čistém stavu, o specifické aktivitě 15 686 jednotek/mg, z vodného extraktu z vepřových ledvin metodou zveřejněnou v časopisu Biochem. Z. 336, 162 (1962). Nevýhodou této metody však je, že se skládá z devíti zdoluhavých, časově náročných a pracných separačních a čisticích stupňů.

Při metodě popsané v časopisu Biochimica 22, 838 (1957) se jako výchozí látka k izolaci aminoacylasy používá acetonového odparku získaného extrakcí vepřových ledvin. Rozmělněný acetonový odparek se extrahuje fosfátovým pufrům, extrakt se nasatí ve dvou stupních síranem amonným a získaná suspenze se dialyzuje. Roztok získaný po dialýze se zahřívá 5 minut na 60°C a pak se frakcionuje ve dvou stupních nasycených roztokem síranu amonného. Získaná sraženina se rozpustí ve vodě, roztok se opět dialyzuje a pak se frakcionuje ve dvou stupních acetonem. Sraženina získaná v posledním frakcionačním stupni se rozpustí ve vodě, roztok se dialyzuje proti destilované vodě a pak se lyofilizuje. Touto metodou, skládající se ze 12 operací, lze získat produkt o specifické aktivitě asi 15 000 jednotek/mg.

Jak je zřejmé ze shora uvedeného popisu, společnou nevýhodou známých metod je, že poskytují žádaný enzym v nízké nebo střední čistotě, a příprava přiměřeně čistého produktu vyžaduje komplexní série operací, skládající se z 9 až 12 čisticích stupňů.

Předložený vynález je zaměřen na odstranění zmíněných nevýhod známých metod. Nový způsob izolace aminoacylasy podle vynálezu se skládá jen z několika málo čisticích operací, které lze snadno provádět, a poskytuje žádanou aminoacylasy o vysoké specifické aktivitě.

Podstata vynálezu spočívá v poznatku, že když se vodný extrakt z vepřových ledvin podrobí působení tepla, pak se odstředí, supernatant se nasatí solí jednomocného kationtu s minerální kyselinou, sraženina ze vzniklé suspenze se oddělí, rozpustí ve vodě, roztok se dialyzuje proti vodě a enzym se z dialyzovaného roztoku izoluje, získá se práškovitá aminoacylasy o specifické aktivitě asi 3 000 až 3 600 jednotek/mg, která se dá používat přímo, bez dalšího čištění, při výrobě preparátů s imobilizovanou aminoacylasou. Podrobí-li se však shora popsaným způsobem získaný práškovitý enzym dvěma dalším chromatografickým čisticím stupňům, získá se velmi čistá aminoacylasy o specifické aktivitě asi 15 000 jednotek/mg. Uvedeným způsobem, který se skládá pouze ze tří separačních a dvou čisticích stupňů, se získá žádaný enzym aminoacylasy v mimořádně čistém stavu. Bylo rovněž zjištěno, že shora popsaným způsobem lze izolovat velmi čistou aminoacylasy ve vynikajících výtěžcích z ledvin jiných savců [jako například z koňských, hovězích nebo králíčích ledvin], které obsahují zmíněný enzym v mnohem nižších koncentracích a doprovázený mnohem větším podílem balastních bílkovin než vepřové ledviny.

Vynález se podle shora uvedeného týká zlepšeného způsobu izolace enzymu aminoacylasy z ledvin savců. Podle vynálezu se při izolaci enzymu postupuje tím způsobem, že se vodný extrakt z ledvin, připravený o sobě známým způsobem, zahřívá při 60 až 80°C po dobu 5 až 12 minut. Teplem zpracovaná směs se odstředí, k supernatantu se přidá 200 až 300 g/litr amonné soli, výhodně síranu amonného. Vzniklá suspenze se odstředí, oddělená sraženina se rozpustí ve vodě. Roztok se dialyzuje proti vodě a popřípadě se podrobí dialyzovaný roztok nebo roztok enzymu izolovaného z dialysátu v pufru o pH 6,5 až 8,5, chromatografií na anexu. Dále se popřípadě podrobí aktivní frakce získané z chromatografického stupně, nebo roztok enzymu vysráženého z aktivních frakcí amonnou solí v pufru o pH 6,0 až 8,0, gelové chromatografií na gelovém filtru, jehož horní hranice frakcionovaných molekulárních hmotností je vyšší než 70 000. Enzym se z aktivních frakcí vysráží amonnou solí.

V prvním stupni způsobu podle vynálezu se vodný extrakt z ledvin zahřívá na 60 až 80 °C po dobu 5 až 15 minut, výhodně na 70 °C po dobu 10 minut. Tímto působením tepla se denaturuje většina bílkovin doprovázejících enzym, který se má izolovat. Denaturované bílkoviny se oddělí z vodného roztoku jako sraženina o velké povrchové ploše. Tato sraženina působí rovněž jako čistící složka, neboť absorbuje většinu nečistot, které zůstaly v rozpuštěném stavu. Tím lze vysvětlit, proč stupeň čistoty získaný po šesti separačních stupních podle postupu popsaného v časopisu J. Biol. Chem. 194, 455 (1952) lze porovnat s čistotou produktu získaného způsobem podle vynálezu již po třech separačních stupních (působení tepla, srážení, dialýsa).

K vodnému roztoku získanému po odstranění denaturovaných bílkovin se za účelem vysrážení surového enzymu přidá 200 až 300 g/litr, výhodně 250 až 280 g/litr, obzvláště výhodně 260 až 270 g/litr, amonné soli. Jako srážecího činidla se výhodně používá síranu amonného, avšak lze rovněž použít i jiných solí, jako chloridu amonného, chloridu sodného a podobných. Vzniklá sraženina se oddělí, rozpustí ve vodě a vodný roztok se o sobě známým způsobem dialýsuje proti vodě.

Z dialysovaného roztoku se může popřípadě izolovat o sobě známým způsobem, jako lyofilizací, sušením za rozprašování, odpařením a podobně, pevný produkt obsahující enzym. Specifická aktivita takto získaného produktu, stanovená při 37 °C, je asi 3 000 až 3 600 jednotek/mg, což odpovídá 20- až 25násobné účinnosti čištění. Uvedený produkt lze používat jako takový, bez jakéhokoli dalšího čištění, pro různé průmyslové účely, na příklad pro výrobu přípravků obsahujících imobilizovaný enzym.

Má-li se shora popsaným způsobem získat surový enzym dále čistit, není naprosto nutné izolovat enzym z dialysovaného roztoku v pevné formě. Dialysovaný roztok lze přímo, popřípadě po úpravě jeho pH, aplikovat na sloupec anexové pryskyřice. Jako anexové pryskyřice se s výhodou používá Sephadexových pryskyřic, jako DEAE-Sephadexu A-50. Použije-li se při chromatografii na anexové pryskyřici jako výchozí látka pevného surového enzymu, aplikuje se tento produkt na sloupec anexu ve formě roztoku ve vhodném pufru, na příklad v 0,05 molárním vodném pufru fosforečnanu draselného (pH = 7,0). Sloupec se ekvilibruje před nanesením enzymu stejným pufrům. Iontoměničová kolona se eluuje s výhodou 0,05 molárním vodným pufrům fosforečnanu draselného o pH 7,0, obsahujícím rovněž chlorid sodný, výhodně v množství 0,3 molu chloridu sodného na litr roztoku; k uvedenému účelu však lze použít i roztoků jiných solí s příslušnou iontovou silou.

Aktivní frakce eluátu se spojí a popřípadě se z nich vysráží pevný produkt obsahu-

jící enzym způsobem popsaným výše. Jako srážecí činidlo se přidává obvykle 200 až 300 g, výhodně 250 až 280 g, zvláště výhodně 260 až 270 g amonné soli na jeden litr roztoku. Pro tento účel se s výhodou používá síranu amonného. Specifická aktivita vysráženého produktu, stanovená při 37 °C, je 6 000 až 6 600 jednotek/mg, což odpovídá 40- až 45násobné účinnosti čištění vzhledem k výchozímu extraktu.

Má-li se částečně vyčištěný enzym získaný shora popsaným způsobem dále čistit, není absolutně nutné izolovat enzym z aktivních frakcí eluátu v pevné formě. Aktivní frakce lze na sloupec gelu aplikovat přímo, popřípadě po úpravě jejich pH. Při čištění gelovou chromatografií se s výhodou používá Sephadexových gelů, jako Sephadexu G-200. V tomto čistícím stupni lze však používat pouze takových gelů, jejichž horní hranice frakcionovaných molekulárních hmotností je vyšší než 70 000. Použije-li se při gelové chromatografii jako výchozí látka pevného produktu obsahujícího enzym, aplikuje se tato látka na sloupec gelu ve formě roztoku v pufru, jako v 0,05 molárním vodném pufru fosforečnanu draselného o pH 7,0. Sloupec gelu se před aplikací enzymu ekvilibruje stejným pufrům. Enzym se ze sloupce gelu eluuje s výhodou 0,05 molárním vodným pufrům fosforečnanu draselného o pH 7,0; lze však používat i jiných zředěných vodných pufrů. Aktivní frakce eluentu se spojí a enzym se z roztoku izoluje vysrážením shora popsaným způsobem. Jako srážecí činidlo se přidává obvykle 200 až 300 g, výhodně 250 až 280 g, zvláště výhodně 260 až 270 g amonné soli na jeden litr roztoku. Pro tento účel se s výhodou používá síranu amonného. Specifická aktivita takto získaného enzymu, stanovená při 37 °C, je asi 15 000 jednotek/mg, to je stupeň čistoty je vynikající.

Surových, částečně přečištěných a čistých pevných produktů obsahujících enzym, získaných způsobem podle vynálezu, lze s výhodou používat pro přípravu imobilizované aminoacylasy. Jak je známo, preparátů s imobilizovanou aminoacylasou se široce používá při štěpení DL-aminokyselin.

Způsob podle vynálezu je podrobně objasněn v následujících příkladech provedení, které však rozsah vynálezu žádným způsobem neomezuji.

Příklad 1

1 kg přečištěných vepřových ledvin se rozmělní a pak zhomogenizuje se 2 litry chladné (+4 °C) destilované vody. Zhomogenizovaná směs se míchá jednu hodinu v ledové lázni a pak se odstředí. Supernatant se zahřeje na 60 °C, udržuje se na této teplotě 15 minut, pak se směs ochladí v lázni s ledovou vodou a odstředí. K supernatantu se přidá 280 g síranu amonného,

směs se ponechá stát přes noc a vzniklá suspenze se odstředí. Oddělená sraženina se rozpustí v malém množství chladné (+4°C) destilované vody a roztok se dialysuje až je prostý solí proti destilované vodě. Zdialysovaný roztok se pak zfiltruje a filtrát se lyofilizuje; získá se 4,2 g aminoacylasy. Aktivita: zhydrolyzování 1 000 μ molů N-acetyl-L-methioninu/hodinu/mg bílkoviny.

Příklad 2

1 kg přečištěných vepřových ledvin se rozmělní a pak zhomogenizuje se 2 litry chladné (+4°C) destilované vody. Zhomogenizovaná směs se míchá 1 hodinu v ledové lázni a pak se odstředí. Supernatant se zahřeje na 80°C, udržuje se na této teplotě 5 minut, pak se směs ochladí v lázni s ledovou vodou a odstředí. K supernatantu se přidá 359 g síranu amonného, směs se ponechá stát přes noc a vzniklá suspenze se odstředí. Oddělená sraženina se rozpustí v malém množství chladné (+4°C) destilované vody a roztok se dialysuje proti destilované vodě až je prostý solí. Zdialysovaný roztok se zfiltruje a filtrát se lyofilizuje; získá se 1,1 g aminoacylasy. Aktivita: zhydrolyzování 800 μ molů N-acetyl-L-methioninu/hodinu/mg bílkoviny.

Příklad 3

8 kg přečištěných vepřových ledvin se rozmělní a pak zhomogenizuje se 16 litry chladné (+4°C) destilované vody. Zhomogenizovaná směs se míchá 1 hodinu v ledové lázni a pak se odstředí. Supernatant se zahřeje na 70°C, udržuje se na této teplotě 10 minut, pak se směs ochladí v lázni s ledovou vodou a odstředí. K supernatantu se přidá 2 554 g síranu amonného, směs se nechá stát přes noc a vzniklá suspenze se odstředí. Oddělená sraženina se rozpustí v malém množství chladné (+4°C) destilované vody a roztok se dialysuje proti destilované vodě až je prostý solí. Zdialysovaný roztok se zfiltruje a filtrát se lyofilizuje; získá se 7,2 g aminoacylasy. Aktivita: hydrolysa 2 735 μ molů N-acetyl-L-methioninu za hodinu/mg bílkoviny.

Příklad 4

3,6 kg přečištěných hovězích ledvin se rozmělní a pak zhomogenizuje se 7,2 litry chladné (+4°C) destilované vody. Zhomogenizovaná směs se míchá jednu hodinu v ledové lázni a pak se odstředí. Supernatant se zahřeje na 70°C, udržuje se na této teplotě 10 minut, pak se směs ochladí v lázni s ledovou vodou a odstředí. K supernatantu se přidá 1 234 g síranu amonného, směs se nechá stát přes noc a vzniklá suspenze se odstředí. Oddělená sraženina se rozpustí v malém množství chladné (+4°C) destilova-

né vody a roztok se dialysuje proti destilované vodě až je prostý solí. Zdialysovaný roztok se zfiltruje a filtrát se lyofilizuje; získá se 3,4 g aminoacylasy. Aktivita: hydrolysa 791 μ mol N-acetyl-L-methioninu/hodinu/mg bílkoviny.

Příklad 5

2,5 kg přečištěných koňských ledvin se rozmělní a pak zhomogenizuje se 5 litry chladné (+4°C) destilované vody. Zhomogenizovaná směs se míchá jednu hodinu v ledové lázni a pak se odstředí. Supernatant se zahřeje na 70°C, udržuje se na této teplotě 10 minut, pak se směs ochladí v lázni s ledovou vodou a odstředí. K supernatantu se přidá 1 200 g síranu amonného, směs se nechá stát přes noc a vzniklá suspenze se odstředí. Oddělená sraženina se rozpustí v malém množství chladné (+4°C) destilované vody a roztok se dialysuje proti destilované vodě až je prostý solí. Zdialysovaný roztok se zfiltruje a filtrát se lyofilizuje; získá se 3,8 g aminoacylasy. Aktivita: hydrolysa 319 μ molů N-acetyl-L-methioninu/hodinu/mg bílkoviny.

Příklad 6

K roztoku 3 g aminoacylasy z vepřových ledvin, připravené způsobem popsáním v příkladu 3, v 0,05 molárním pufru fosforečnanu draselného o pH 7,0 se přidá 50 g DEAE Sephadexu A-50, předem ekvilibrovaného stejným roztokem pufru. Suspenze se míchá 3 hodiny v lázni s ledovou vodou a pak se nechá stát přes noc v lednici při +4°C. Příští den se pryskyřice promyje třemi dávkami po 1 litru shora uvedeného pufru, pak se rozmíchá v 1 litru stejného pufru a suspenze se naplní do trubice o průměru 5,3 cm a o výšce 55 cm. Sloupec pryskyřice se pak vymývá 0,05 molárním pufrům fosforečnanu draselného (pH = 7,0), který obsahuje 0,3 molu chloridu sodného, průtokovou rychlostí 200 ml/hodinu. Efluent se jímá ve frakcích po 100 ml. Frakce, které vykazují enzymatickou aktivitu, se spojí a k roztoku se přidá 80 g síranu amonného; vyloučí se 0,7 g aminoacylasy. Aktivita: hydrolysa 5 240 μ molů N-acetyl-L-methioninu/hodinu/mg bílkoviny.

Příklad 7

25 ml suspenze enzymu získané způsobem popsáním v příkladu 6, obsahující 57 mg bílkoviny, se odstředí a oddělená sraženina se rozpustí v 9 ml 0,05 molárního pufru fosforečnanu draselného o pH 7,0. Roztok se nanese na horní konec trubice o průměru 2,4 cm a výšce 43 cm, naplněné gelem Sephadex G-200, který byl předem ekvilibrován stejným pufrům. Sloupec se pak eluuje stejným pufrům průtokovou rychlostí 60 ml/

/hodinu; efluent se jímá ve frakcích po 5 ml. Frakce, které vykazují enzymatickou aktivitu, se spojí a k roztoku se přidá 9 g síra-

nu amonného; získá se 25 mg aminoacylasy. Aktivita: hydrolysa 10 000 μ molů N-acetyl-L-methioninu/hodinu/mg bílkoviny.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob izolace enzymu aminoacylasy z vodného extraktu ledvin savců, vyznačující se tím, že se extrakt zahřívá při 60 až 80 °C po dobu 5 až 15 minut, teplem zpracovaná směs se odstředí, k supernatantu se přidá 200 až 300 g/litr amonné soli minerální kyseliny, vzniklá suspenze se odstředí, oddělená sraženina se rozpustí ve vodě, roztok se dialysuje proti vodě, a popřípadě se zdialysovaný roztok, nebo roztok enzymu izolovaného z dialysátu v pufru o pH 6,5 až 8,5 podrobí chromatografii na měničích aniontů, a potom se popřípadě aktivní frakce získané z chromatografického stupně, ne-

bo roztok enzymu vysráženého z aktivních frakcí přidáním amonné soli v pufru o pH 6,0 až 8,0, podrobí gelové chromatografii na gelovém filtru, jehož horní hranice frakcionovaných molekulárních hmotností je vyšší než 70 000, a enzym se z aktivních frakcí vysráží amonnou solí.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se extrakt zahřívá při 70 °C po dobu 10 minut.

3. Způsob podle bodu 1 nebo 2, vyznačující se tím, že se jako amonné soli používá síranu amonného.