



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

252482

(11) (B2)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 11/08

(22) Přihlášeno 29 03 84
(21) PV 3128-85
(32) (31)(33) Právo přednosti od 11 07 83
(2469/83) Maďarská lidová republika

(40) Zveřejněno 15 01 87

(45) Vydáno 15 07 88

(72) Autor vynálezu BOROSS LÁSZLÓ dr., DALA ERZSÉBET, BUDAPEŠT, KISS ARANKA dr., SZEGED,
SZAJÁNI BÉLA dr., TETZLI ÁRPÁD, BUDAPEŠT (MLR)
(73) Majitel patentu REANAL FINOMVEGYSZERGYÁR, BUDAPEŠT (MLR)

(54) Způsob imobilizace enzymu karboxypeptidázy

Způsob imobilizace enzymu karboxypeptidázy B získaného zvláště ze slinivky břišní savců. Enzym karboxypeptidázy B se nanáší z roztoku v pufru o hodnotě pH 4,5 až 8,5 na aktivovaný nosič z kyseliny akrylové a/nebo z kyseliny metakrylové popřípadě z akrylamidu nebo metakrylamidu obsahující alespoň 0,1 m ekv/g funkčních karboxylových skupin. Takto imobilizovaný enzym se promyje, skládá se ve formě vodné suspenze při teplotě 0 až 4 °C a popřípadě suší.

Vynález se týká způsobu imobilizace enzymu karboxypeptidázy B.

Jakožto obchodní produkt dostupný enzym karboxypeptidázy B se izoluje za slinivky břišní vepře. Podle odborné literatury se však může tento enzym izolovat také z pankreatu jiných savců, například z pankreatu hovězího dobytka nebo koz.

Podle článku zveřejněného v časopise J. Biol. Chem. 235, str. 2 272 /1960/ se vepřový pankreas vyřízne a autolýzuje se při teplotě místnosti. Obsažený tuk se z orgánu odstraní extrakcí acetonem, směsí acetonu a etheru a nakonec etherem, tuku zbavený orgán se pak usuší a převede se na prášek. Acetonový prášek se extrahuje vodou a extrakt se frakcionuje síranem amonným. Produkt se postupně podrobí odsolení, iontové výměně (sloupcovou chromatografií na DEAE-celulóze) a vysrážení síranem amonným. Sraženina se zbaví solí dialýzou nebo gelovou filtrací. Enzym se skladuje ve zmrazeném stavu, jelikož lyofilizace snižuje aktivitu o 25 až 45 %.

Specifická aktivita produktu je 184,2 jednotek/mg (při teplotě 25 °C, měřeno za použití hippuryl-L-argininového substrátu), což odpovídá -16 až 17násobnému čištění ve srovnání s extraktem získaným z autolýzované tkáně.

Tento způsob je v praxi obecně rozšířen.

Podle publikace v časopise Biochemistry 1, str. 1 069 (1962) se enzym karboxypeptidázy B může připravovat v krystalické formě aktivací čištěného zimogenu, to znamená enzymu prokarboxypeptidázy B. Při tomto způsobu se jakožto výchozí látky používá rovněž vodného extraktu acetonického přášku pankreasu. Vodný extrakt obsahuje enzym prokarboxypeptidázy B, který se podrobuje chromatografickému čištění nejdříve na DEAE-celulóze a poté na DEAE-Sephadexu. Enzym prokarboxypeptidázy B se převádí tripsinem na aktivní enzym karboxypeptidázy B, který se pak podrobuje krystalizaci.

Podle článku uveřejněného v časopise Biochem. 163, str. 253 (1977) se popisuje způsob izolace enzymu karboxypeptidázy B z lidského pankreatu. Výroba acetonického prášku, vysrážení síranem amonným a chromatografie na DEAE-celulóze jsou v podstatě stejné, jako je popsáno v článku J. Biol. Chem. 235, str. 2 272 (1960). Způsob, popsáný pro zpracování lidského pankreatu, se liší od shora popsaných způsobů jedině koncentrací použitého pufru a gradienty eluentů při chromatografii na DEAE-celulóze. Takto získaný enzym karboxypeptidázy B se rozděluje na dvě frakce, a to B₁ a B₂ chromatografií prováděnou na inontoměniči Whatmanovy karboxymethylcelulózy. Specifická aktivita frakcí B₁ a B₂ je 1 192 jednotek/-mg, popřípadě 862 jednotek/mg (při teplotě 37 °C, měřeno na hippuryl-L-argininovém substrátu), což odpovídá ve srovnání s vodným extraktem 108násobnému, popřípadě 78násobnému vyčištění. Enzym karboxypeptidázy B se může izolovat také z pankreatu kozy [Indian J. Biophys. 12, str. 24 (1975), popřípadě 13, str. 106 (1976)].

Jakožto podstatné charakteristiky tohoto způsobu se uvádějí:

Pankreas kozy se zmrazí na teplotu -20 °C, ve zmrazeném stavu se rozřeže a při teplotě +4 °C se shromažďuje vytékající buněčná kapalina. Shromážděná kapalina se podrobuje autolýze. Hodnota pH roztoku se upraví na 4,6, roztok se zředí destilovanou vodou na desetinásobný objem a vzniklá suspenze se nechává stát při teplotě +4 °C po dobu dvou až tří hodin. Převážná část aktivního karboxypeptidázového enzymu se vysráží. Sraženina se extrahuje hydroxidem barnatým při hodnotě pH 10,0 až 10,4. Z extraktu se enzym nechá vykristalovat při hodnotě pH 6,5 a čtyřikrát se překrystaluje.

Další čištění takto získaného produktu je popsáno v článku časopisu Indian J. Biochem. Biophys. 13, str. 106 (1976). Podle tohoto způsobu se při hodnotě pH 6,5 vysrážený produkt rozpustí v 0,2 molárním roztoku hydroxidu barnatého, hodnota pH se upraví kyselinou octovou na 7,0 a látka se dále čistí frakcionací prováděnou síranem amonným a opakovanou

iontovou výměnou na DEAE-celulóze. Roztok enzymu, zbavený solí, se skladuje při teplotě -20°C .

Specifická aktivita produktu je 102,66 jednotek/mg (měřeno na hippuryl-L-argininovém substrátu), což odpovídá 44násobnému vyčištění.

Podle článku uveřejněného v časopise J. Mol. Catal. 10, str. 253 (1981) se vodný extrakt acetonického prášku z pankreatu kozy frakcionuje síranem amonným a frakce získaná při 0,3 až 0,7násobném syčení se podrobuje chromatografii na CM-Sephadexu C-50 a DEAE-celulóze. Specifická aktivita takto získaného produktu je 82,9 jednotek/mg (měřeno na hippuryl-L-argininovém substrátu), což odpovídá 18,2násobnému čištění.

Společný nedostatek shora uvedených způsobů je založen na tom, že se používá jakožto výchozí látky buněčné kapaliny pankreasu nebo acetonického prášku orgánu. Shromažďování buněčné kapaliny je obtížné a v případě pankreatu vepře je prakticky neproveditelné pro vysoký obsah tuku a slizu v orgánu. Výroba acetonického prášku vyžaduje použití nákladných rozpouštědel, jak z hlediska požární bezpečnosti, tak z hlediska nebezpečí výbuchů (acetón, ether). Lokální zahřátí může škodit enzymu, tak že výtěžky a specifická aktivita klesají. Dalším nedostatkem je, že produkt uspokojivé čistoty je výrobitelný jen za pomoci komplikovaného pracovního postupu sestávajícího z mnoha operací.

Cílem vynálezu je proto odstranit shora uvedené nedostatky známých způsobů a vyvinout způsob, podle kterého se homogenizovaný a autolyzovaný pankreas ředí pufrem, jehož hodnota pH je 5,0 až 8,5, s výhodou 6,0, v poměru 1:1 a potom se tepelně zpracovává při teplotě 50 až 75°C po dobu 5 až 30 minut, účelně při teplotě 60°C po dobu 20 minut. Při tomto tepelném zpracování se převážná část proteinů provázejících izolovaný enzym denaturuje. Denaturovaný protein se vysráží z vodného roztoku ve formě sraženiny s velkým povrchem a pro své čířící působení strhne velkou část zbylých nečistot v roztoku. Tím se odstraní obtížná a nákladná příprava acetonického prášku pankreatu.

Imobilizovaného enzymu karboxypeptidázy B se může používat pro stanovení koncových karboxylových skupin $-\text{COOH}$ aminokyselin proteinů a peptidů nebo k dělení DL-argininu nebo DL-lysinu.

Cílem vynálezu je vyvinout způsob imobilizace přípravků imobilizovaného enzymu karboxypeptidázy B.

Způsobem podle vynálezu se mají vyrobit přípravky imobilizovaného enzymu karboxypeptidázy B, které obsahují enzym na chemicky inertním nosiči, který je neomezeně odolný proti působení mikroorganismů, má dobré mechanické vlastnosti a umožňuje vysokou průtokovou rychlost. Dalším požadavkem je aby se enzym s nosičem mohl vázat za mírných reakčních podmínek.

Zjistilo se, že shora uvedeným požadavkům na nosič dokonale vyhovují nosiče z monomerní kyseliny akrylové a/nebo kyseliny metakrylové, popřípadě z monomerního akrylamidu a/nebo metakrylamidu vytvořené za pomoci zesíťujícího prostředku akrylového nebo allylového typu (jako je například N,N'-metylenbisakrylamid, etylendiakrylát nebo N,N-diallylvinová kyselina ve formě amidu) mající charakter gelu s alespoň 0,1 m ekv/g, s výhodou 2 až 8 m ekv/g funkčních karboxyskupin. Uvedené nosiče enzymu se mohou vyrábět o sobě známými způsoby.

Funkční karboxyskupiny použitých nosičů enzymu se mohou o sobě známými způsoby zpracováním s karbodiimidy aktivovat. Takto zpracované nosiče enzymu jsou vhodné pro vázání enzymu karboxypeptidázy B. Reakce se také může provádět za mírných podmínek (při teplotě 0 až 4°C a hodnotě pH 7,0).

Způsobem podle vynálezu se připravují imobilizované přípravky enzymu karboxypeptidázy B, při kterém se polymerní gel, získaný z kyseliny akrylové a/nebo z kyseliny metakrylové, popřípadě z akrylamidu a/nebo z metakrylamidu a obsahující alespoň 0,1 m ekv/g funkčních

karboxyskupin, zpracovává s karbodiimidovou sloučeninou rozpustnou ve vodě nebo v organických rozpouštědlech při teplotě pod 0 °C, na takto aktivovaný nosič se nanáší enzym karboxypeptidázy B v roztoku o hodnotě pH 4,5 až 8,5, získaný imobilizovaný enzym se promyje a popřípadě se suší.

Jakožto polymerů se může s výhodou použít shora uvedených polymerů Acrylex C. Jakožto enzymu lze použít enzymu karboxypeptidázy B jakéhokoliv původu.

K aktivaci kopolymerů jakožto nosičů enzymu se může použít například N-cyklohexyl-N'-[2-(4-morfolinyl)etyl]karbodiimidmethyl-p-toluensulfonát nebo N-etyl-N'-(3-dimethylamino-propyl)karbodiimidhydrochlorid. S výhodou se používá ve vodě rozpustných karbodiimidových sloučenin. Jestliže se má použít jen v organických rozpouštědlech rozpustných karbodiimidových sloučenin, mohou přicházet v úvahu deriváty, které jsou dostatečně rozpustné v uvedených organických rozpouštědlech při teplotě pod 0 °C.

Enzym karboxypeptidázy B se na aktivovaný nosič, jaký již byl uveden, nanáší z roztoku o hodnotě pH 4,5 až 8,5. Hodnota pH je však účelně 6,0 až 7,0. Jakožto reakčního prostředí se účelně používá 0,05 až 0,1-molárního roztoku kaliumfosfátového pufru o hodnotě pH 7,0.

Po kopulační reakci získaný imobilizovaný enzymový přípravek se o sobě známým způsobem promyje a popřípadě se usuší. Enzymový přípravek se však také může skladovat ve formě vodné suspenze při teplotě v až 4 °C.

Specifická aktivita enzymového přípravku vyrobeného způsobem podle vynálezu je 600 až 900 μmol hydrolyzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg xerogelu a tato hodnota je pro praktickou použitelnost velmi příznivá.

Další jednotlivosti a způsob podle vynálezu blíže objasňují následující příklady praktického provedení, které však vynález nijak neomezuje.

P ř í k l a d 1

Na strojku pro maso se umele 0,25 kg vepřového pankreatu, pak se přidá 250 ml 0,05-molárního Tris-HCl-pufru (hodnota pH 7,0) a směs se nechá stát noc při teplotě +4 °C. Příští den se suspenze zahřeje na teplotu 37 °C a nechá se stát po dobu jedné hodiny při této teplotě. Suspenze orgánu se pak odstředí, supernatant se zahřeje na teplotu 50 °C a při této teplotě se inkubuje po dobu 30 minut. Po přidání 2 dílů objemových ledově chladného pufru se směs odstředí. Do supernatantu se přidá 42,2 g síranu amonného. Směs se nechá stát přes noc, suspenze se odstředí, sraženina se odloží. Hodnota pH supernatantu se upraví na 7,0 až 7,2. Po přidání 36,1 g síranu amonného se suspenze nechá stát přes noc a pak se odstředí. Sraženina se rozpustí v Tris-HCl-pufru (o hodnotě pH 7,0) a o teplotě +4 °C a destilovanou vodou se dialyzuje k odstranění soli. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí. Výtěžkem je 343 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 17,5 μmol hydrolyzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

P ř í k l a d 2

Na strojku pro maso se umele 0,25 kg vepřového pankreatu, pak se přidá 250 ml 0,05-molárního Tris-HCl-pufru (hodnota pH 7,0) a směs se nechá stát přes noc při teplotě +4 °C. Příští ráno se suspenze zahřeje na teplotu 37 °C a při této teplotě se nechá stát po dobu jedné hodiny. Suspenze orgánu se pak odstředí, supernatant se zahřeje na teplotu 60 °C a při této teplotě se inkubuje po dobu dalších 10 minut. Po přidání 2 dílů objemových ledově chladného pufru se směs odstředí. Do supernatantu se přidá 92 g síranu amonného. Jelikož se po stání přes noc nevyloučí žádná sraženina, přidá se do roztoku po nastavení hodnoty pH na 7,0 až 7,2 dalších 78,7 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí. Sraženina se rozpustí ve studeném (teplota +4 °C) Tris-HCl-pufru

(o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje se destilovanou vodou do dokonalého odstranění solí. Po dialýze se roztok filtruje a zmrazí se. Výtěžek je 295 mg enzymu karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 53,1 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

Příklad 3

Na strojku pro maso se mele 0,25 kg vepřového pankreatu, načež se přidá 250 ml 0,05-molárního Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a směs se nechá stát přes noc při teplotě +4 °C. Příští ráno se suspenze ohřeje na teplotu 37 °C a nechá se stát po dobu jedné hodiny při této teplotě. Suspenze orgánu se odstředí, supernatant se ohřeje na teplotu 60 °C a při této teplotě se inkubuje po dobu dalších 20 minut. Po přidání 2 dílů objemových ledové chladné pufru se směs odstředí. Do supernatantu se přidá 98,2 g síranu amonného. Jelikož se po stání přes noc nevyloučí žádná sraženina, upraví se hodnota pH roztoku na 7,0 až 7,2 a přidá se dalších 86,9 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí se. Sraženina se rozpustí ve chladném (o teplotě +4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje se destilovanou vodou dokonalého odstranění solí. Po dialýze se roztok filtruje a zmrazí se. Získá se 266 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 63,2 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

Příklad 4

Na strojku pro maso se umele 0,25 kg vepřového pankreatu, poté se přidá 250 ml 0,05-molárního Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a směs se nechá stát přes noc při teplotě +4 °C. Příští ráno se suspenze zahřeje na teplotu +37 °C a nechá se stát při této teplotě po dobu jedné hodiny. Suspenze orgánu se odstředí, supernatant se zahřeje na teplotu 75 °C a při této teplotě se inkubuje po dobu dalších 5 minut. Po přidání 2 dílů objemových ledové chladné pufru se směs odstředí. K supernatantu se přidá 66,9 g síranu amonného. Jelikož se po stání přes noc nevyloučí žádná sraženina, přidá se do roztoku po nastavení hodnoty pH na 7,0 až 7,2 dalších 55,8 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí se. Sraženina se rozpustí ve studeném (teplota +4 °C) Tris-HCl-pufu (hodnota pH 7,0) a dialýzuje se destilovanou vodou až do dokonalého odstranění solí. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí. Výtěžek je 34 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 21,6 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

V následující tabulce se uvádí vliv teploty a doby tepelného zpracování homogenizátu vepřového pankreatu na aktivitu enzymu karboxypeptidázy B, přičemž 1 jednotka odpovídá enzymu, který katalýzuje hydrolýzu 1,0 μ mol hippuryl-L-argininu za minutu (měřeno za teploty 25 °C a hodnoty pH 7,65).

Tabulka 1

Vliv teploty a doby trvání tepelného zpracování homogenizátu vepřového pankreatu na aktivitu enzymu karboxypeptidázy B

Teplo- ta °C	Doba min	Celková akti- vita jednotka/kg pankreatu	Celkový protein mg/kg pankreatu	Specifická akti- vita jednotka/mg
50	30	23 968	1 372	17,5
60	10	62 660	1 180	53,1
	20	67 260	1 064	63,2
75	5	2 932	136	21,6

P ř í k l a d 5

Na strojku pro maso se umele 0,25 kg vepřového pankreatu a nechá se stát přes noc při teplotě místnosti. Příští ráno se přidá 250 ml 0,05-molárního acetátového pufru (hodnota pH 5,0). Suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá se stát při této teplotě po dobu 20 minut. Po přidání 2 dílů objemových ledově chladné vody se směs odstředí. Do supernatantu se přidá 274,8 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc, odstředí a sraženina se odloží.

Do supernatantu se po nastavení hodnoty pH na 7,0 až 7,2 přidá 232,9 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí se. Zbytek se rozpustí ve studeném (teplota +4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje se destilovanou vodou k dokonalému odstranění solí. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí. Výtěžek je 360 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 14,8 μmol hydrolyzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

P ř í k l a d 6

Na masovém strojků se umele 0,25 kg vepřového pankreatu a nechá se stát přes noc při teplotě místnosti. Příští ráno se přidá 250 ml 0,05-molárního roztoku acetátového pufru (o hodnotě pH 5,5). Suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá se stát při této teplotě po dobu 20 minut. Po přidání 2 dílů objemových ledově chladné vody se směs odstředí. Do supernatantu se přidá 261,2 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc, poté se odstředí a sraženina odloží. Do supernatantu se po nastavení hodnoty pH na 7,0 až 7,2 přidá 228 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí se. Zbytek se rozpustí ve studeném (teplota +4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje se destilovanou vodou, až do dokonalého odstranění solí. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí. Získá se 317 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 20,3 μmol hydrolyzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

P ř í k l a d 7

Na strojku pro maso se umele 0,3 kg vepřového pankreatu a nechá se stát při teplotě místnosti přes noc. Příští ráno se přidá 300 ml 0,05-molárního fosfátového pufru (hodnota pH 6,0). Suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá se stát při této teplotě po dobu 20 minut. Po přidání 2 dílů objemových ledově chladné vody se směs odstředí. Do supernatantu se přidá 301 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc, potom se odstředí a sraženina se odloží. Do supernatantu se po nastavení hodnoty pH na 7,0 až 7,2 se přidá 252,6 g síranu amonného.

Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí se. Zbytek se rozpustí ve studeném (+4 °C) tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje se destilovanou vodou až do dokonalého odstranění solí. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí. Výtěžek je 517 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 57 μmol hydrolyzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

P ř í k l a d 8

Na strojku pro maso se umele 0,3 kg vepřového pankreatu a nechá se stát při teplotě místnosti přes noc. Příští ráno se přidá 300 ml 0,05-molárního fosfátového pufru (hodnota pH 6,5). Suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá se stát po dobu 20 minut při této teplotě. Při přidání 2 dílů objemových ledově chladné vody se směs odstředí. Do supernatantu se přidá 326 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc, poté se odstředí a sraženina se odloží. Do supernatantu se po nastavení hodnoty pH na 7,0 až 7,2 přidá 275 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí se. Zbytek se rozpustí ve studeném (teplota +4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje se destilovanou vodou až do dokonalého odstranění solí. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí. Výtěžek

je 361 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 43,8 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

P ř í k l a d 9

Na strojku pro maso se umele 0,3 kg vepřového pankreatu a nechá se stát při teplotě místnosti přes noc. Příští ráno se přidá 300 ml 0,05 molárního fosfátového pufru (o hodnotě pH 7,0). Suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá se stát po dobu 20 minut při této teplotě. Po přidání 2 dílů objemových ledové chladné vody se směs odstředí. Do supernatantu se přidá 326 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc, poté odstředí a sraženina se odloží. Do supernatantu se po nastavení hodnoty pH na 7,0 až 7,2 přidá 272 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí. Zbytek se rozpustí ve studeném (teplota +4 °C) Tris-HCl-pufu (hodnota pH 7,0) a dialýzuje se destilovanou vodou až do dokonalého odstranění solí. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí. Výtěžek je 488 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 39,9 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/-min/mg proteinu.

P ř í k l a d 10

Na strojku pro maso se rozemele 0,25 kg vepřového pankreatu a nechá se stát pře noc při teplotě místnosti. Příští ráno se přidá 250 ml 0,05-molárního Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,5). Suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá se stát při této teplotě po dobu 20 minut. Po přidání 2 dílů objemových ledové studené vody se směs odstředí. Do supernatantu se přidá 247 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc, poté odstředí a sraženina se odloží. Do supernatantu se po nastavení hodnoty pH na 7,0 až 7,2 přidá 202 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí. Zbytek se rozpustí ve studeném (o teplotě +4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje destilovanou vodou až do dokonalého odstranění solí. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí. Výtěžek je 695 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 17,4 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/-min/mg proteinu.

P ř í k l a d 11

Na strojku pro maso se rozemele 0,25 kg vepřového pankreatu a nechá se stát přes noc při teplotě místnosti. Příští ráno se přidá 250 ml 0,05 molárního Tris-HCl-pufu (hodnota pH 8,0). Suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá se stát při této teplotě po dobu 20 minut. Po přidání 2 dílů objemových ledové chladné vody se směs odstředí. Do supernatantu se přidá 225 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc, poté se odstředí a sraženina se odloží.

Do supernatantu se po nastavení hodnoty pH na 7,0 až 7,2 přidá 198 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí se. Zbytek se rozpustí ve studeném (teplota +4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje destilovanou vodou až do dokonalého odstranění solí. Dialýzovaný roztok se zfiltruje a zmrazí. Výtěžek je 552 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 14,3 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

P ř í k l a d 12

Na strojku pro maso se rozemele vepřový pankreas v množství 0,25 kg a nechá se stát přes noc při teplotě místnosti. Příští ráno se přidá 250 ml 0,05-molárního Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 8,5). Suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá se stát při této teplotě po dobu 20 minut. Po přidání 2 dílů objemových ledové chladné vody se směs odstředí. Do supernatantu se přidá 247 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc, poté odstředí a sraženina se odloží. Do supernatantu se po nastavení hodnoty pH na 7,0 až 7,2 přidá 197 g síranu amonného. Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí. Zbytek se rozpustí ve studeném (+4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje destilovanou vodou až

do dokonalého odstranění solí. Dialyzovaný roztok se zfiltruje a zmrazí. Výtěžek je 1 209 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 6,4 μmol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

V tabulce 2 se uvádí vliv hodnoty pH pufru použitého při tepelném zpracování homogenizovaného vepřového pankreatu na aktivitu karboxypeptidázy B.

T a b u l k a 2

Vliv hodnoty pH pufru použitého při tepelném zpracování (60 °C po dobu 20 minut) homogenizovaného vepřového pankreatu na aktivitu karboxypeptidázy B

Hodnota pH	Celková aktivita jednotka(kg pankreatu)	Celkový protein mg/kg pankreatu	Specifická aktivita jednotka/mg
5,0	21 348	1 440	14,8
5,5	25 808	1 268	20,3
6,0	98 333	1 724	57,0
6,5	52 767	1 204	43,8
7,0	64 882	1 625	39,9
7,5	48 400	2 780	17,4
8,0	31 632	2 210	14,3
8,5	30 753	4 863	6,4

P ř í k l a d 13

Na strojku na maso se rozemele 0,25 kg vepřového pankreatu a nechá se stát přes noc při teplotě místnosti. Příští ráno se přidá 250 ml 0,05-molárního fosfátového pufru (o hodnotě pH 6,0). Suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá se stát po dobu 20 minut při této teplotě. Po přidání 2 dílů objemových ledově chladné vody se suspenze odstředí. Supernatant se upraví přidáním síranu amonného až do koncentrace 340 g/l (408 g). Suspenze se nechá stát přes noc, poté se odstředí, sraženina se odloží a do supernatantu se přidá síran amonný až do koncentrace 370 g/l (41,1 g). Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí. Sraženina se rozpustí ve studeném (+4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje destilovanou vodou až do odstranění veškerých solí. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí. Výtěžek je 95 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 56,2 μmol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

P ř í k l a d 14

Na strojku pro maso se rozemele 0,2 kg vepřového pankreatu a nechá se stát přes noc při teplotě místnosti. Příští ráno se přidá 200 ml 0,05-molárního fosfátu pufru (o hodnotě pH 6,0). Suspenze se ohřeje na teplotu 60 °C a nechá se po dobu 20 minut při této teplotě. Po přidání 2 dílů objemových ledově chladné vody se suspenze odstředí. Do supernatantu se přidá síran amonný až do koncentrace 330 g/l (33g). Suspenze se nechá stát přes noc, poté se odstředí a sraženina se odloží. Supernatant se nasýtí síranem amonným až do koncentrace 370 g/l (44,8 g). Suspenze se nechá stát přes noc potom se odstředí. Sraženina se rozpustí ve studeném (teplota +4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje destilovanou vodou až do dokonalého odstranění solí. Výtěžek je 62 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 89,0 μmol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

P ř í k l a d 15

Na strojku pro maso se rozemele 0,25 kg vepřového pankreatu a nechá se stát přes noc při teplotě místnosti. Příští ráno se přidá 250 ml 0,05 molárního fosfátového pufru (o hodnotě pH 6,0). Suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá se stát při této teplotě

po dobu 20 minut. Po přidání 2 dílů objemových ledově chladné vody se suspenze odstředí. Supernatant se nasytí síranem amonným až do koncentrace 320 g/l (386 g). Suspenze se nechá stát přes noc, potom odstředí, sraženina se odloží a supernatant se nasytí síranem amonným až do koncentrace 370 g/l (65 g). Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí se. Sraženina se rozpustí ve studeném (+4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje destilovanou vodou až do odstranění solí. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí. Výtěžek je 106,5 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 95,5 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

P ř í k l a d 16

Na strojku pro maso se rozemele 0,2 kg vepřového pankreatu a nechá se stát přes noc při teplotě místnosti. Příští ráno se přidá 200 ml 0,05-molárního fosfátového pufru (o hodnotě pH 6,0). Suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá stát při této teplotě po dobu 20 minut. Po přidání 2 dílů objemových ledově studené vody se suspenze odstředí. Supernatant se nasytí síranem amonným až do koncentrace 310 g/l (310 g). Suspenze se nechá stát přes noc, poté odstředí, sraženina se odloží a supernatant se nasytí síranem amonným až do koncentrace 370 g/l (67,2 g). Suspenze se nechá stát přes noc a potom se odstředí. Sraženina se rozpustí ve studeném (+4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje destilovanou vodou až do dokonalého odstranění solí. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí. Výtěžek je 135 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 44,3 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

P ř í k l a d 17

Na strojku na maso se rozemele 0,25 kg vepřového pankreatu a nechá se stát přes noc při teplotě místnosti. Příští ráno se přidá 250 ml 0,05-molárního fosfátového pufru (o hodnotě pH 6,0). Suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá se stát při této teplotě po dobu 20 minut. Po přidání 2 dílů objemových ledově chladné vody se suspenze odstředí. Supernatant se nasytí síranem amonným až do koncentrace 320 g/l (386,4 g). Suspenze se nechá stát přes noc, potom odstředí, sraženina se odloží a supernatant se nasytí síranem amonným do koncentrace 360 g/l (52 g). Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí se. Sraženina se rozpustí ve studeném (+4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje destilovanou vodou až do dokonalého odstranění solí. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí. Výtěžek je 76 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 123,8 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

P ř í k l a d 18

Na strojku pro maso se rozemele 0,25 kg vepřového pankreatu a nechá se stát přes noc při teplotě místnosti. Příští ráno se přidá 250 ml molárního fosfátového pufru (o hodnotě pH 6,0). Suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá stát při této teplotě po dobu 20 minut. Po přidání 2 dílů objemových ledově chladné vody se suspenze odstředí. Supernatant se nasytí síranem amonným až do koncentrace 320 g/l (386,4 g). Suspenze se nechá stát přes noc, poté se odstředí, sraženina se odloží a supernatant se nasytí síranem amonným až do koncentrace 350 g/l (39 g). Suspenze se nechá stát přes noc a potom se odstředí. Sraženina se rozpustí ve studeném (+4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje destilovanou vodou až do dokonalého odstranění solí. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí se. Výtěžek je 45 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 286,7 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

P ř í k l a d 19

Na strojku pro maso se rozemele 0,25 kg vepřového pankreatu a nechá se stát přes noc při teplotě místnosti. Příští ráno se přidá 250 ml 0,05 molárního fosfátového pufru (o hodnotě pH 6,0). Suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá se stát po dobu 20 minut při této teplotě. Po přidání 2 dílů objemových ledově chladné vody se suspenze odstředí.

Supernatant se nasytí síranem amonným do koncentrace 320 g/l (386,4 g). Suspenze se nechá stát přes noc, poté se odstředí, sraženina odloží a supernatant se nasytí síranem amonným až do koncentrace 340 g/l (26 g). Suspenze se nechá stát přes noc a odstředí se. Sraženina se rozpustí ve studeném (+4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje se destilovanou vodou až do dokonalého odstranění solí. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí. Výtěžek je 25,5 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 195,8 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

V následující tabulce se uvádí vliv frakcionace síranem amonným na aktivitu karboxypeptidázy B.

T a b u l k a 3

Působení frakcionace síranem amonným na aktivitu karboxypeptidázy B.

Koncentrace síranu amonného/g/l 1.sycení 2.sycení		Celková aktivita jednotky/kg proteinu	Celkový protein mg/kg pankreatu	Specifická aktivita jednotka/mg
340	370	21 373	380	56,2
330	370	27 670	310	89,0
320	370	40 697	426	95,5
310	370	29 914	675	44,3
320	360	37 629	304	123,8
320	350	51 610	180	286,7
320	340	19 877	102	195,8

P ř í k l a d 20

Na strojku pro maso se rozele 1 kg hovězího pankreatu a nechá se stát přes noc při teplotě místnosti. Příští ráno se přidá jeden litr 0,05-molárního fosfátového pufru (hodnota pH 6,0) a suspenze se zahřeje na teplotu 60 °C a nechá stát při této teplotě po dobu 20 minut. Po přidání 2 dílů objemových (3,8 litrů) ledově chladné vody se suspenze odstředí. Supernatant se nasytí síranem amonným až do koncentrace 320 g/l (1,6 kg). Suspenze se nechá stát přes noc, potom se odstředí a sraženina odloží. Supernatant se nasytí síranem amonným až do koncentrace 350 g/l (165 g).

Suspenze se nechá stát přes noc a poté odstředí. Sraženina se rozpustí ve studeném (+4 °C) Tris-HCl-pufu (o hodnotě pH 7,0) a dialýzuje se destilovanou vodou až do dokonalého odstranění solí. Po dialýze se roztok zfiltruje a zmrazí. Výtěžek je 238,7 mg karboxypeptidázy B. Specifická aktivita je 15,4 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu.

P ř í k l a d 21

Suspenduje se 1 g Akrixu C-100 xerogelu (obsah karboxyskupin: $6,2 \pm 0,3$ m-skv./g v 50 ml 0,1-molárního roztoku kaliumfosfátového pufru, načež se do suspenze na ledově chladné lázni za stálého míchání přidá roztok 2 g N-cyklohexyl-N'-[2-/4-morfolinyl/etyl]-karbo-diimidmethyl-p-toluensulfonátu ve 20 ml chladného (+4 °C) roztoku pufru. Po 10minutovém míchání se do roztoku přidá vodný roztok karboxypeptidázy B (koncentrace: 16,45 mg/ml, specifická aktivita enzymu: 17 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu). Reakční doba je 48 hodin, přičemž se směs dvakrát míchá vždy po dobu 6 hodin. Gel se odstraní, promyje se třikrát vždy 100 ml 0,1-molárního roztoku kaliumfosfátového pufru (o hodnotě pH 7,0), třikrát vždy 100 ml 0,1-molárního roztoku kaliumfosfátového pufru obsahujícího 1 mol chloridu sodného (o hodnotě pH 7,0) a třikrát vždy 100 ml 0,1-molárního roztoku kaliumfosfátového pufru (o hodnotě pH 7,0). Gel se nakonec promyje pětkrát vždy 200 ml destilované vody a lyofilizuje se. Výtěžek je 1,43 g. Aktivita je 690 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg suché látky.

P ř í k l a d 22

Suspenduje se 1 g Akrilex C-100 xerogelu (obsah karboxyskupin: $6,2 \pm 0,3$ m-ekv./g) v 50 ml 0,1-molárního roztoku kaliumfosfátového pufru (o hodnotě pH 7,0). Do suspenze se potom na ledově chladné lázni přidá za stálého míchání roztok 2 g N-cyklohexyl-N'-[2-(4-morfolinyl)etyl] karbodiimidmethyl-p-toluensulfonátu ve 20 ml studeného (+4 °C) roztoku pufru. Po 10minutovém míchání se do roztoku přidá 15,5 ml vodného roztoku karboxypeptidázy B (koncentrace: 16,45 mg/ml, specifická aktivita enzymu: 17 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu). Reakční doba je 48 hodin, přičemž se v průběhu této doby dvakrát vždy po dobu 6 hodin. Gel se oddělí, třikrát promyje vždy 100 ml 0,1-molárního roztoku kaliumfosfátového pufru (o hodnotě pH 7,0), třikrát vždy 100 ml 0,1-molárního roztoku kaliumfosfátového pufru obsahujícího 1 mol chloridu sodného (o hodnotě pH 7,0) a třikrát vždy 100 ml 0,1-molárního roztoku kaliumfosfátového pufru (o hodnotě pH 7,0). Gel se nakonec promyje pětkrát vždy 200 ml destilované vody a lyofilizuje se. Výtěžek je 1,6 g. Aktivita je 880 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/g suché látky.

P ř í k l a d 23

Suspenduje se 1 g Akrilex C-100 xerogelu (obsah karboxylových skupin: $6,2 \pm 0,3$ m-ekv./g) v 50 ml 0,1-molárního roztoku kaliumfosfátového pufru (o hodnotě pH 7,0), načež se do suspenze na ledově chladné lázni za stálého míchání přidá roztok 2 g N-cyklohexyl-N'-[2-(4-morfolinyl)etyl] karbodiimidmethyl-p-toluensulfonátu ve 20 ml studeného (+4 °C) roztoku pufru. Po 10minutovém míchání se do roztoku přidá 62 ml vodného roztoku karboxypeptidázy B (koncentrace: 16,45 mg/ml, specifická aktivita enzymu: 17 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg proteinu).

Reakční doba je 48 hodin, přičemž se v průběhu této doby směs dvakrát míchá vždy po dobu 6 hodin. Gel se oddělí a promyje se třikrát vždy 100 ml 0,1-molárního roztoku kalimfosfátového pufru (o hodnotě pH 7,0), třikrát vždy 100 ml 0,1-molárního roztoku kaliumfosfátového pufru obsahující 1 mol chloridu sodného (o hodnotě pH 7,0) a třikrát vždy 100 ml 0,1-molárního roztoku kaliumfosfátového pufru (o hodnotě pH 7,0). Nakonec se gel promyje pětkrát vždy 200 ml destilované vody a lyofilizuje. Výtěžek je 1,55 g. Aktivita je 740 μ mol hydrolýzovaného hippuryl-L-argininu/min/mg suché látky. V tabulce 4 se uvádí imobilizace karboxypeptidázy B.

T a b u l k a 4

Imobilizace enzymu karboxypeptidázy B

Složení reakční směsi			Aktivita produktu		Imobilizovaná aktivita		Imobilizovaný protein		V rozpuštěné formě regenerovaná aktivita		Ztráta aktivity		Specifická aktivita	
1x	2x	3x	jednotka/g xerogelu		jednotka %		jednotka %		jednotka %		jednotka %		jednotka %	
AC-100	CMC	CPB												
g	g	g												
1	2	510	630		1 008 11,6		313,7 61,5		207,0 2,4		7 444,1 86,0		3,21 19,51	
1	1	510	690		987 11,4		328,0 64,3		285,0 3,3		7 367,8 85,3		3,00 18,23	
1	2	255	880		1 408 32,5		102,0 40,0		73,3 1,7		2 848,3 65,8		13,80 83,89	
1	2	1 020	740		1 147 6,6		655,6 64,3		371,9 2,1		15 799,1 91,3		1,75 10,63	

1x = AC-100, Akrilex 100

2x = CMC, N-cyklohexyl-N'-[2-(4-morfolinyl)etyl]karbodiimidmetyl-p-toluensulfonát

3x = CPB, karboxypeptidáza B

4x = specifická aktivita rozpuštěného enzymu se považuje za 100 %

OPRAVA

popisu vynálezu k patentu č. 252 482

Int. Cl.⁴ C 12 N 11/08

V popisu vynálezu k patentu č. 252 482 není dotištěn
úplný název vynálezu.

Správně má být:

Způsob imobilizace enzymu karboxypeptidázy B

Úřad pro vynálezy a objevy

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob imobilizace enzymu karboxypeptidázy B, vyznačující se tím, že polymerní gel, připravený z kyseliny akrylové a/nebo z kyseliny metakrylové, popřípadě z akrylamidu a/nebo z metakrylamidu, obsahující alespoň 0,1 m ekv /g funkčních karboxylových skupin, se zpracuje karbodiimidovou sloučeninou rozpustnou ve vodě nebo v organickém rozpouštědle při teplotě pod 0 °C, na takto aktivovaný nosič se nanese enzym karboxypeptidázy B z roztoku pufru o hodnotě pH 4,5 až 8,5, s výhodou 6,0 až 7,0, takto získaný imobilizovaný enzym se promyje a popřípadě se usuší.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se nosiče, karbodiimidu a enzymu používá v poměru 1:1 až 2:0,25 až 1, zvláště v poměru 1:2:0,25.