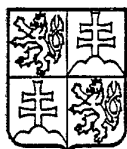


ČESKÁ
A SLOVENSKÁ
FEDERATIVNÍ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ
ÚŘAD PRO
VYNÁLEZY

- (21) Číslo přihlášky: **8406-88**
(22) Přihlášeno: 19. 12. 88
(40) Zveřejněno: 18. 11. 92
(47) Uděleno: 28. 12. 92
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 02. 93

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁵:
C 12 N 13/00

(73) Majitel patentu:
Ústav fyziologie hospodářských zvířat SAV,
Košice, CS;

(72) Původce vynálezu:
Sova Oto MUDr. CSc., Košice, CS;
Dobránsky Tomáš ing., Košice, CS;

(54) Název vynálezu:
**Spôsob izolácie enzýmu lysozýmu z
biologických materiálov**

(57) Anotace:
Účelom riešenia je zlepšiť izoláciu enzýmu lysozýmu z biologických materiálov v priemyselnej výrobe. Uvedený účel sa dosiahne tak, že sa využíva existencia izoelektrického bodu enzýmu lysozýmu, kde autofokusáciou pôsobením jednosmerného elektrického prúdu pri napätí 200 až 1 000 V sa vydeľuje zo zmesi bielkovín a enzýmov v roztoku o vodivosti 100 až 800 lS.cm⁻¹ pri pH 10,00 až 10,60. Táto frakcia sa podrobí deliacej technike využívajúcej rozdielne molekulové hmotnosti, s výhodou gélovej chromatografii. Opakovaním alebo zamieňaním oboch techník možno dosiahnuť čistý enzým. Spôsob izolácie enzýmu lysozýmu z biologických materiálov má použitie v chemickom a potravinárskom priemysle.

Vynález sa týka spôsobu izolácie enzýmu lysozýmu /EC 3.2.1.17/ z biologických materiálov.

Podľa doterajších postupov sa lysozým získaval niekoľkými pochodmi, zahrňujúcimi rôzne zrážacie systémy a separácie ako aj chromatografickými pochodmi v rôznych usporiadaniach. Ich spoločnou nevýhodou bola prácnosť, náročnosť na vybavenie, pričom čistota enzýmu bola na úrovni zmesi bielkovín približne rovnakej molekulovej hmotnosti, kde podstatnú časť tvoril lysozým, ale ich prímies bola od 5 do 10 %. Tieto balastné bielkoviny znižujú mernú aktivitu a spôsobujú aj iné vedľajšie efekty, ako postupnú degradáciu izolátu. V našich vynálezoch /CS autorské osvedčenie č. 211 856, 234 801/ je chránený principiálne nový spôsob delenia a čistenia látok na základe ich izoelektrického bodu spôsobom samočinnej izoelektrickej fokusácie pôsobením jednosmerného elektrického prúdu v rôznorodom roztoku delenej látky, ktorý je mechanicky stabilizovaný, ako aj viacero druhov zariadení na uskutočňovanie tohto spôsobu.

Vyššie opísané nedostatky doterajších čistiacich a izolačných postupov pri získavaní lysozýmu v podstatnej miere odstraňuje vynález, ktorého podstata spočíva v tom, že vodivosť biologického materiálu, obsahujúceho lysozýmovú aktivitu, sa dialýzou alebo ultrafiltráciou upraví na hodnoty 100 až 800 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ a obsah bielkovín sa upraví na hodnoty 1 až 30 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Roztok sa potom autofokusuje jednosmerným elektrickým prúdom pri napätí 200 až 1 000 V a príkone najviac 3 $\text{W} \cdot \text{l}^{-1}$ a po ukončení autofokusácie sa frakcie s najvyššími aktivitami, s výhodou pri pH 10,00 až 10,60 izolujú a podrobia deliacej technike využívajúcej ako kritérium rozdielnu molekulovú hmotnosť delených látok, s výhodou gélovú chromatografiu, pričom v závislosti na požadovanej čistote sa jedna alebo obe deliace techniky opakujú aspoň jedenkrát.

Predmetný vynález odstraňuje nutnosť používania solí pre vysolovanie a zrážanie bielkovín, ktoré značia značné znečistenie okolia a ťažkosti pri ich neutralizovaní. Látka je čistená podľa dvoch kritérií na rozdiel od doterajších spôsobov, kde bola čistená len na základe svojej molekulovej hmotnosti.

Príklad 1.

Vaječné bielka z 1 200 vajec, ktoré dávajú okolo 30 litrov bielkoviny sa zriedia vodovodnou vodou v pomere 1:2,5 čím sa získa okolo 100 litrov roztoku bielkovín v koncentrácii do 3 $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Takto upravený roztok sa podrobí dialýze proti vodovodnej vode počas 12 hodín pri teplote 10 °C. Potom sa roztok aplikuje do autofokusačnej aparatury objemu 100 l, ktorá sa napojí na zdroj jednosmerného prúdu o príkone 3 $\text{W} \cdot \text{l}^{-1}$. Autofokusácia sa deje pri teplote 10 °C až kým prúd klesne pri hraničnom napätí 1 000 V aspoň na desatinu pôvodnej hodnoty ako pri začiatku autofokusácie. V autofokusačnej aparatúre sa vytvorí stúpajúce rozhranie pH v každej pracovnej komôrke od anódy ku katóde. Lysozým sa nachádza vo frakciách s pH medzi 10,00 až 10,60. Obsah komôrok sa uvedeným pH zjednotí a podrobí refokusácii v autofokusérii

objemu 10 l. Po poklese prúdu na desatinu pôvodnej hodnoty t.j. blízko nule sa lysozým nachádza v komôrkach s pH medzi 10,20 až 10,40 v čistejšom stave. Získa sa 180 g enzýmu lysozýmu.

Príklad 2

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že po autofokusácii sa frakcie lysozýmu podrobia gélovej chromatografii na stĺpci modulového sita /Spheron P-40/. Majoritná frakcia obsahuje lysozým, ktorého aktivita je 20 000 U/mg proteínu /95 % vykazuje lysozýmovú aktivitu/. Aktivita 1 U predstavuje zníženie absorban- cie suspenzie *Micrococcus luteus* /kmeň 331/ pri 450 nm, pH 6,6 a teplote 30 °C za 1 min o 0,001.

Vynález môže nájsť využitie pri výrobe enzýmu lysozýmu v technologickom meradle pre jeho výrobu pre potreby potravinár- stva, chemického priemyslu, vedeckého výskumu a iné odvetvia.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

Spôsob izolácie enzýmu lysozýmu z biologických materiálov, vyznačujúci sa tým, že obsah bielkovín v roztoku biologického materiálu vykazujúceho lysozýmovú aktivitu vo vode sa upraví riedením na 1 až 30 g.l⁻¹ a vodivosť sa ultrafiltráciou alebo dialýzou upraví na 100 až 800 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ a roztok s enzymatickou aktivitou sa potom autofokusuje jednosmerným elektrickým prúdom pri napätí 200 až 1 000 V a 3 W.l⁻¹ pokiaľ hodnota prúdu neklesne pod jednu desatinu pôvodnej hodnoty a roztok s najvyššou enzyna- tickou aktivitou, s výhodou pri pH 10,00 až 10,60 sa izoluje a podrobí deliacej technike využívajúcej rozdielnu molekulovú hmotnosť delených látok, s výhodou gélovej chromatografii, pričom v závislosti na požadovanej čistote sa jedna alebo obe deliace techniky opakujú aspoň jedenkrát.

Konec dokumentu
