



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

205 722

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlásené 19 02 79
(21) PV 1069-79

(51) Int. Cl.³ C 08 L 5/00

(40) Zverejnené 29 08 80
(45) Vydané 01 09 83

(75) Autor vynálezu GEMEINER PETER ing., CSc., DROBNICA ĽUDOVÍT doc. ing. DrSc., ANTAL MIROSLAV
prom. chem. a KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy polysacharid-bielkovinových komplexov

1

Vynález sa týka spôsobu prípravy polysacharid-bielkovinových komplexov vhodných na izoláciu a purifikáciu proteolytických enzýmov.

V poslednej dobe sa dosiahli dobré výsledky pri izolácii a purifikácii proteolytických enzýmov použitím afinitnej chromatografie. Ako afinanty sa tu používali napr. modifikované D-aminokyseliny, peptidy zložené z D-aminokyselín či špecifické inhibítory bielkovinovej povahy (Methods in Enzymology 19 (Proteolytic Enzymes) 1970; Methods in Enzymology 34 (Affinity Techniques) 1974). Väčšina z generálnych afinantov tohto typu vzhľadom k náročnej príprave zatiaľ nenašla praktické uplatnenie. Z tohto hľadiska sa ako afinanty perspektívne javia ľahšie dostupné bielkoviny, napr. sérové či vaječné albumíny, ktoré sú prirodzenými substrátmi proteolytických enzýmov. Použitie takýchto afinantov je ovšem spojené s ich úpravou vedúcou k strate substrátových vlastností pri zachovaní afinity voči proteolytickým enzýmom.

Vzhľadom k tomu, že väčšina uvedených afinantov sa viaže na polysacharidy cez svoje aminoskupiny, pri ich viazaní sa vychádzalo z polysacharidov predtým aktivovaných vysoko-toxickým brómkyanom (P. Cuatrecasas, J. Biol. Chem. 245/1970/3059; J. Porath, T. Kristiansen, The Proteins, 3rd edn, Vol. 1, pp. 95-179; 1975).

Naše výsledky výskumu v tejto oblasti ukázali, že polysacharid-bielkovinové komplexy je možné pripraviť jednodušnou reakciou polysacharidu obsahujúceho terciárne aminoskupiny s bielkovinou v prítomnosti epichlórhydrínu tak, že ich potom možno použiť na izolá-

205 722 |

ciu a purifikáciu proteolytických enzýmov.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že polysacharid obsahujúci terciárne aminoskupiny, výhodne O-/N,N-dietylamo-2-hydroxy-propyl (DEAHP) sieťovaný škrob alebo O-/N,N-dietyl- aminoetyl (DEAE) celulóza, sa nechá reagovať s bielkovinou výhodne vaječným alebo sérovým albumínom rozpusteným v tlmivom roztoku pH 8 až 9 za použitia 2 až 80 % epichlórhydrínu na váhu suchého polysacharidu, za stáleho miešania, po dobu 1,5 až 3 hodín, pri laboratórnej teplote, pri hydromodule 10 až 11, načo sa produkt premýva vodou, 1 M chloridom sodným, znovu vodou až do negatívnej reakcie na bielkoviny u každého z eluentov, a nakoniec naj- prv voľne a potom vákuovo pri 40 °C sa vysuší.

Najvýhodnejší z polysacharidov je sieťovaný škrob pre značnú reaktivitu jeho hydroxy- lových skupín, relatívne veľké rozmery zrna a dobrú filtrovateľnosť. Zavedenie DEAHP sku- piny ako terciárneho amínu vo funkcii vnútorného katalyzátora je výhodné tak z economic- kých dôvodov, ako i s ohľadom na vlastnosti konečného produktu (čs. autorské osvedčenie č. 168 055):

Sieťovanie škrobu s epichlórhydrínom je volené tak, aby napúšťací objem sa pohyboval v medziach 10 až 15 ml/g, viazanie terciárnych aminoskupín na polysacharid zase tak, aby výmenná kapacita anexu vykazovala hodnoty 0,6 až 1 mekv/g. Bielkovinu je potom možné via- zať už s malými prídavkami epichlórhydrínu, pričom produkt obsahuje do 0,2 g bielkoviny naviazanej na 1 g polysacharidu. Takýto produkt má hydrodynamické vlastnosti východiskové- ho polysacharidu.

Po ukončení reakcie je nutné produkt dôkladne odsáť a pred sušením jemne rozotrieť na filtračnom papieri.

Suchý polysacharid-bielkovinový komplex s obsahom bielkoviny 0,2 g/g polysacharidu je vhodným materiálom na izoláciu a purifikáciu proteolytických enzýmov.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy polysacharid-bielkovinových komplexov pre izo- láciu a purifikáciu proteolytických enzýmov je, že:

- umožňuje pripraviť produkty s obsahom do 1 g bielkoviny na 1 g polysacharidu,
- viazanie bielkoviny na polysacharidový nosič je jednostupňové,
- vychádza z netoxických chemikálií,
- preparáty možno vyrábať z domácich lacných surovín pomerne jednoduchým technologickým postupom,
- viazanie bielkoviny na polysacharidový nosič prebieha v miernych podmienkach,
- viazanie bielkoviny na polysacharidový nosič možno viesť tak, aby bielkovina stratila svoje substrátové vlastnosti pri zachovaní afinity voči proteolytickým enzýmom.

Príklad 1

11 g suchého DEAHP sieťovaného škrobu s napúšťacím objemom 12,5 ml/g a s výmennou ka- pacitou 0,6 mekv/g sa nechá napúšťať v 110 ml 0,5 uhličitanového tlmivého roztoku pH 9 ob- sahujúceho 27,5 g vaječného albumínu a za stáleho miešania, pri laboratórnej teplote, sa

prikvapkáva 0,55 ml epichlórhydrínu. Zmes sa nechá miešať 2 hodiny, produkt sa premyje vodou, 1 M chloridom sodným a znovu vodou do negatívnej reakcie na bielkoviny v každom z eluátov. Po dôkladnom odsatí sa produkt voľne vysuší na filtračnom papieri a vákuovo dosuší pri 40 °C. Preparát obsahuje 2,2 g naviazaného albumínu.

Príklad 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že prikvapávame 2,8 ml epichlórhydrínu, a ďalej pokračujeme ako v príklade 1.

Preparát obsahuje 8,1 g naviazaného albumínu.

Príklad 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že prikvapávame 5,15 ml epichlórhydrínu, a ďalej pokračujeme ako v príklade 1.

Preparát obsahuje 10,2 g naviazaného albumínu.

Príklad 4

Postup ako v príklade 1 s tým rozdielom, že prikvapávame 7,45 ml epichlórhydrínu, a ďalej pokračujeme ako v príklade 1.

Preparát obsahuje 10,8 g naviazaného albumínu.

Príklad 5

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že použijeme 0,5 M fosforečnanový tlmivý roztok pH 8, a ďalej pokračujeme ako v príklade 1.

Preparát obsahuje 1,35 g naviazaného albumínu.

Príklad 6

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že použijeme 11 g DEAE celulózy s výmennou kapacitou 1,0 mekv/g, a ďalej pokračujeme ako v príklade 1.

Preparát obsahuje 1,8 g naviazaného albumínu.

Príklad 7

Postup podľa príkladu 4 s tým rozdielom, že pridáme 8,25 g vaječného albumínu, a ďalej pokračujeme ako v príklade 4.

Preparát obsahuje 4,75 g naviazaného albumínu.

Príklad 8

Postup podľa príkladu 4 s tým rozdielom, že pridáme 13,75 g vaječného albumínu, a ďalej pokračujeme ako v príklade 4.

Preparát obsahuje 8 g naviazaného albumínu.

Príklad 9

Postup podľa príkladu 4 s tým rozdielom, že použijeme 8,25 g hovädzieho sérového

205 722 |
albumínu, a ďalej pokračujeme ako v príklade 4.

Preparát obsahuje 4,5 g naviazaného albumínu.

Vynález má uplatnenie všade, kde je potrebné izolovať alebo purifikovať proteolytické enzýmy či už v priemyselnej praxi alebo vo výskume.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy polysacharid-bielkovinových komplexov, vyznačujúci sa tým, že polysacharid obsahujúci terciárne aminoskupiny, výhodne O-/N,N-dietylamino-2-hydroxypropyl/sieťovaný škrob alebo O-/N,N-dietylaminoetyl/celulóza, sa nechá reagovať s bielkovinou výhodne vaječným alebo sérovým albumínom rozpusteným v tlmivom roztoku pH 8 až 9 za použitia 2 až 80 % epichlórhydrínu na váhu suchého polysacharidu, za stáleho miešania, po dobu 1,5 až 3 hodín, pri laboratórnej teplote, pri hydromodule 10 až 11, načo sa produkt premýva vodou, 1 M chloridom sodným, znovu vodou až do negatívnej reakcie na bielkoviny u každého z eluentov, a nakoniec najprv na vzduchu a potom vákuovo pri 40 °C vysuší.