

POLSKA
RZECZPOSPOLITA
LUDOWA



URZĄD
PATENTOWY
PRL

OPIS PATENTOWY

51 398

Patent dodatkowy
do patentu

Kl. 6 a, 22/07

Zgłoszono: 07.VII.1964 (P 105 116)

Pierwszeństwo: 19.IX.1963 Niemiecka
Republika
Demokratyczna

MKP C 12-4 7/026

UKD

Opublikowano: 6.IV.1966

BIBLIOTEKA

Urzędu Patentowego
Polskiej Rzeczypospolitej Ludowej

Współtwórcy wynalazku: dr Horst Hanson, dr Dietmar Gläser

Właściciel patentu: VEB Arzneimittelwerk Dresden, Drezno (Niemiecka
Republika Demokratyczna)

Sposób otrzymywania czystej krystalicznej leucynoaminopeptydazy

1

Wynalazek dotyczy sposobu otrzymywania dobrze oczyszczonej leucynoaminopeptydazy w postaci krystalicznej z soczewek ocznych wołów.

Leucynoaminopeptydaza jest fermentem rozszczepiającym białko, który stosuje się w dziedzinie badań białek, jak na przykład przy analizie strukturalnej peptydów i białek albo przy sprawdzaniu optycznej czystości syntetycznie wytworzonych peptydów, jak również do przemysłowego wytwarzania optycznie czynnych aminokwasów.

Dotychczas stosowany przemysłowo sposób otrzymywania oczyszczonej leucynoaminopeptydazy opisany jest w J. Biol. Chem. 212, 255 (1955). W sposobie tym leucynoaminopeptydazę oczyszcza się w kilku etapach, które obejmują: otrzymywanie suchego proszku z nerek świń, pierwsze wytrącenie siarczanem amonowym, drugie wytrącenie siarczanem amonowym, frakcjonowanie chlorkiem magnezowym, frakcjonowanie przez denaturację na gorąco, frakcjonowanie acetonem, frakcjonowanie przez starzenie, dalsze oczyszczanie przez elektroforezę.

Sposób ten jest skomplikowany, gdyż oprócz wyżej wymienionych czynności wymaga jeszcze dodatkowych zabiegów, takich jak dializa, eluowanie po elektroforezie i tym podobne, przy czym otrzymuje się produkt z małą wydajnością o aktywności $C_1 = 70 - 90$.

Dalsze badania wykazały, że postępowanie takie nie prowadzi do uzyskiwania produktu o powta-

2

rzalnych właściwościach. Prowadzenie tego znanego procesu w skali przemysłowej pozwala na otrzymanie leucynoaminopeptydazy wykazującej aktywność $C_1 = 7 - 10$, w nielicznych przypadkach do 25.

Tak więc tą metodą otrzymywano także leucynoaminopeptydazę o aktywności poniżej wartości $C_1 = 50 - 60$.

W ostatnim czasie stwierdzono (J. Biol. Chem. 240, 253 (1965), że preparaty leucynoaminopeptydazowe o wartości C_1 do 90, które otrzymane były wyżej wymienionym sposobem z nerek świńskich, zawierają jeszcze endopeptydazę, w związku z czym nie nadają się do analizy strukturalnej peptydów. Jednocześnie w wyżej przytoczonej literaturze podano do wiadomości ulepszenie dotychczasowej metody, według której można otrzymywać preparaty leucynoaminopeptydazy o aktywności $C_1 = 150$. Ten nowy sposób jak też i poprzedni jest jednakże kosztowny i nie wchodzi w grę przy wykorzystaniu przemysłowym.

Znany jest również sposób otrzymywania leucynoaminopeptydazy z soczewek oczu wołów (J. Biol. Chem. 238, (1963) i Hoppe — Scyler's Z. physiol. Chem. 329, 249 (1962). Tylko ten ostatni sposób jest na tyle uproszczony, że może się nadawać do stosowania w przemyśle. Sposób ten polega na kombinacji strącania leucynoaminopeptydazy siarczanem amonowym i ciągłej elektroforezie. Sposób ten jest jednak niedogodny w związku ze stosowa-

niem ciągłej elektroforezy, która połączona jest z kosztowną aparaturą i pozwala otrzymywać tylko stosunkowo małe ilości oczyszczonej leucynoaminopeptydazy o aktywności $C_1 = 50 - 70$.

Zadaniem wynalazku było opracowanie metody przemysłowej otrzymywania dobrze oczyszczonej, krystalicznej leucynoaminopeptydazy o aktywności C_1 , co najmniej 150 w sposób jak najbardziej ekonomiczny.

Stwierdzono, że można otrzymać krystaliczną leucynoaminopeptydazę o aktywności C_1 przynajmniej 150, jeżeli produkt homogenizacji soczewek ocznych wołów z roztworem NaCl oczyszczony wstępnie w znany sposób od obcej proteiny przez dodanie siarczynu cynku i ewentualnie chlorku manganu przy wartości pH = 7,2 — 7,4 ogrzewa się w temperaturze 48° — 54°C w ciągu 5 — 30 minut, korzystnie 10 — 15 minut, usuwa wydzielony osad a z roztworu wytrąca w znany sposób enzym przez dodanie stałego siarczanu amonowego lub przez doprowadzenie pH do wartości 4,9 odpowiadającej punktowi izoelektrycznemu.

Sposobem według wynalazku w porównaniu z dotychczas znanymi sposobami otrzymuje się w ciągu krótkiego czasu krystaliczny ferment o optymalnym stopniu czystości i znacznie szerszych możliwościach stosowania.

W następującym przykładzie wyjaśniono bliżej sposób według wynalazku.

Przykład. 12 g wołowych soczewek ocznych z możliwie młodych zwierząt (do około 2-letnich) homogenizuje się ze 100 ml 0,9%-owego roztworu NaCl. Do surowego homogenizatu wkrapla się ostrożnie na zmianę 1 molowy roztwór $MnCl_2$ i 1 molowy roztwór $ZnSO_4$ dopóki nie osiągnie się

stężenia 0,005 m $MnCl_2$, względnie 0,006 m $ZnSO_4$. Jednocześnie utrzymuje się wartość pH = 7,2 — 7,4 przez dodanie 1 mola roztworu NaOH. Powstający osad odwirowuje się i odrzuca. Pozostałość utrzymuje się przez 12 minut na łaźni wodnej w temperaturze 54°C i występujący przy tym osad usuwa się przez odsączenie. Przesącz stanowi już preparat leucynoaminopeptydazy o wysokiej czystości. Po dodaniu 0,35 g stałego siarczanu amonowego na 1 ml przesączu rozpoczyna się krystalizacja enzymu, która po 1 do 2 dniach w temperaturze 4°C jest zakończona. Oddzielone kryształy przemycia się wodą destylowaną w celu doprowadzenia pH do wartości = 5,0 — 5,5. Przez zmianę wartości pH na 8 kryształy przechodzą do roztworu. Na ogół ze 100 g soczewek ocznych wołów otrzymuje się 20 — 35 mg krystalicznego enzymu o aktywności $C_1 = 130 - 180$.

Zastrzeżenie patentowe

Sposób otrzymywania czystej, krystalicznej leucynoaminopeptydazy z soczewek ocznych wołów, **znamienny tym**, że produkt homogenizacji surowych soczewek ocznych wołów z roztworem chlorku sodowego, oczyszczony wstępnie w znany sposób, przez wytrącenie substancji balastowych przy pH = 7,2 — 7,4 za pomocą siarczanu cynku i ewentualnie chlorku manganu ogrzewa się w temperaturze 54°C w ciągu 10 — 15 minut po czym wytrącony osad oddziela się a z przesączu, wytrąca w znany sposób leucynoaminopeptydazę przez dodanie stałego siarczanu amonowego lub przez doprowadzenie pH roztworu do wartości 4,9, odpowiadającej punktowi izoelektrycznemu.