



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

235 292

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 25 01 84
(21) PV 579-84

(51) Int. Cl.³ C 12 N 9/48

(40) Zveřejněno 31 08 84
(45) Vydáno 01 10 87

(75)
Autor vynálezu

ŠAFÁŘÍK IVO ing., SLANÝ

(54) Způsob izolace proteolytických enzymů

Izolace podle vynálezu se provádí adsorpcí proteas na dřevěné piliny. Eluce proteas se provádí roztoky anorganických solí, např. síranem a chloridem sodným, draselným nebo amonným.

Vynález se týká způsobu izolace proteolytických enzymů.

Proteolytické enzymy se ze směsí /živná média po kultivaci produkčních mikroorganismů, hrubé extrakty živočišných tkání nebo rostlinných pletiv a pod./ izolují celou řadou metod, např. srážením síranem amonným nebo vhodnými organickými rozpouštědly, ultrafiltrací, ionexovou, gelovou a afinitní chromatografií a dalšími technikami. Významné místo mezi nimi zaujímá afinitní chromatografie, využívající specifických reverzibilních interakcí mezi ligandem (substrát, analog substrátu, inhibitor, protilátka), který bývá imobilizován na vhodném inertním nerozpustném nosiči, a izolovanou proteasou (Lowe, C.R., Dean, P.D.G.: Afinitní chromatografie, SNTL Praha, 1979, str. 154; Vesa, V.S.: Prikl. Biochim. Mikrobiol. 16, 629 (1980); Glemža, A.A.: Prikl. Biochim. Mikrobiol. 18, 792 (1982)).

Jako typické příklady je možno uvést izolaci pepsinu na sloupci polylysin-Sepharosy 4B (Nevaldin, B., Kessell, B.: Biochim. Biophys. Acta 250, 207 (1971)), izolaci proteas z mouky ze sladované pšenice na sloupci hemoglobin-Sepharosy (Chua, G.K., Bushuk, W.: Biochim. Biophys. Res. Commun. 37, 545 (1969)), izolaci pankreatického trypsinu na ovomukoid-Spheronu (Turková, J., Seifertová, A.: J. Chromatogr. 148, 293 (1978)), nebo izolaci proteas z hovězí pankreatické šťávy na sloupci Sepharosy s navázaným inhibitorem trypsinu ze sojových bobů (Reeck, G.-R., Walsh, K.A., Neurath, H.: Biochemistry 10, 4690 (1971)).

Typické afinitní sorbenty pro izolaci proteas jsou připravovány imobilizací vhodných ligandů na nerozpustné nosiče. Přitom je nutno často použít několikastupňový proces pro aktivaci nosiče, jsou vyžadovány speciální chemikálie apod.

Způsob izolace proteolytických enzymů z komplexních směsí podle vynálezu spočívá v tom, že proteasy obsažené v roztoku se absorbují na dřevěné piliny. Jejich eluce se provádí roztoky anorganických solí, s výjimkou solí ovlivňujících enzymovou aktivitu, s výhodou sírany a chloridy sodnými, draselnými a amonnými. K izolaci lze použít tradiční kolonové uspořádání. Výhodou tohoto způsobu izolace je jednoduchá příprava sorbentu z velmi dostupné suroviny (pilin).

Vynález je dokumentován příklady použití.

Příprava sorbentu

Dřevěné piliny (maximální rozměr částic byl 2 mm) byly opakovaně promývány 2 - 4 % roztokem hydroxidu sodného, vodou, 1 - 3 % roztokem kyseliny chlorovodíkové a opět vodou, dokud se uvolňovalo hnědé barvivo. Poté byl sorbent rezsuspendován ve vodě a byly naplněny skleněné kolony. Kolony byly dále promývány vodou, roztokem chloridu sodného nebo síranu amonného (1 mol.l^{-1}) a opět vodou, dokud absorbance vodných a síranových promyvů při 280 nm a tloušťce vrstvy 1 cm nebyla menší než 0,01 až 0,03.

Příklad 1

Na kolonu z pilin borovice o rozměrech 170 x 12 mm bylo aplikováno 10 ml modelového vzorku obsahujícího 10 mg trypsinu a 100 mg enzymového hydrolyzátu kaseinu. Balastní bílkoviny byly z kolony vymyty vodou. Adsorbovaný trypsin byl z kolony eluován zvýšením iontové síly prostředí (elucí roztokem síranu amonného, 1 mol.l^{-1}). Obsah bílkovin byl sledován Lowryho metodou a aktivita proteasy azokaseinovou metodou za následujících podmínek stanovení: 1 ml 1 % roztoku azokaseinu ve fosfátovém pufru ($0,2 \text{ mol.l}^{-1}$) o pH 7,2 se smísí s 0,5 ml vzorku, po 30 min inkubace při 37 °C se přidá 1,5 ml 5 % kyseliny trichloroctové. Po odstředění sraženiny se měří absorbance supernatantu při 366 nm proti slepému vzorku. Linearita je zaručena do hodnoty absorbance 2.

Z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami při eluci vodou vymylo 35,4 % aktivity, při eluci roztokem síranu amonného se v objemu 45 ml

vymyle 47,1 % aktivity a v celkovém objemu 150 ml se roztokem síranu amonného vymyle 53,3 % z vnesené aktivity. Specifická aktivita trypsinu se po chromatografii zvýšila 11,7-krát.

Příklad 2

Za analogických podmínek jako v příkladu 1 (rozměr sloupce 150 x 12 mm) byla provedena chromatografie 10 mg trypsinu pro bakteriologii (cca 7 let starý preparát), rozpuštěného v 10 ml vody. Z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami při eluci vodou vymyle 24,9 % aktivity, při eluci roztokem síranu amonného se v celkovém objemu 145 ml vymyle 80,3 %. Specifická aktivita trypsinu se po chromatografii zvýšila 1,7-krát.

Příklad 3

Za analogických podmínek jako v příkladu 1 (rozměr sloupce 200 x 12 mm) byla provedena izolace proteasy produkované do živného media kmenem *Bacillus* sp., který byl izolován z půdy. Po aplikaci 10 ml kultivačního media byly balastní bílkoviny vymyty vodou a adsorbované proteasy roztokem síranu amonného (1 mol.l^{-1}). Z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami vymyle 19,8 % aktivity, při eluci roztokem síranu amonného se v objemu 150 ml vymyle 65,1 % aktivity. Specifická aktivita proteasy se po chromatografii zvýšila 70-krát.

Příklad 4

Na sloupci pilin o rozměrech 200 x 12 mm byla provedena chromatografie kyselého vyčeřeného hovězího, pankreatického extraktu. Extrakt byl před aplikací na kolonu 24 hod dialyzován proti tekoucí vodě a poté nechán 24 hod při laboratorní teplotě, aby byla umožněna konverze trypsinogenu a chymotrypsinogenu na aktivní proteasy. Bylo aplikováno 6 ml roztoku, z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami při eluci vodou vymyle 9,5 % aktivity, při eluci roztokem NaCl (1 mol.l^{-1}) se v objemu 130 ml vymyle 83,2 % aktivity. Specifická aktivita proteasy se po chromatografii zvýšila čtyřikrát.

Příklad 5

Pro izolaci proteasy produkované *Bacillus* sp. byly s úspěchem použity rovněž piliny smrkové a dubové a eluce byly možno dosáhnout roztoky chloridu sodného a chloridu draselného (1 mol.l^{-1}).

1. Způsob izolace proteolytických enzymů, vyznačující se tím, že se proteasy obsažené v roztoku adsorbují na dřevěné piliny, jejich eluce se provádí roztoky anorganických solí s výjimkou solí, které ovlivňují enzymovou aktivitu, s výhodou sírany a chloridy sodnými, draselnými a amonnými.