

CO7g 7/02

URZĄD PATENTOWY



RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

OPIS PATENTOWY

Nr 15085.

Kl. 12 p 17.

Kalle & Co. Aktiengesellschaft
(Biebrich n. R., Niemcy).

Sposób rozdzielania proteinaz i karboksywielopeptydaz.

Zgłoszono 29 listopada 1930 r.

Udzielono 23 listopada 1931 r.

Pierwszeństwo: 9 grudnia 1929 r. (Niemcy).

Trypsyna składa się z mieszaniny dwóch proteaz, a mianowicie z właściwej rozszczepiającej proteinazy i z enzymu, rozszczepiającego wielopeptydy. Enzym ten odróżnia się od peptydaz erepsyny tem, że działa tylko na łańcuchy welopeptydów, zawierających wolną grupę karboksylową, podczas gdy znane dotychczas peptydazy rozszczepiają tylko peptydy, zawierające wolne grupy aminowe. Z tego powodu oznaczono wielopeptydazę trypsyny jako karboksy-wielopeptydazę.

Oddzielenie zawartej w trypsynie proteinazy od karboksywielopeptydazy zdołano przeprowadzić przez absorbcję zapomocą szczególnych gatunków tlenku glinu.

Wynik oddzielenia zależy stanowczo od należytego wytwarzania preparatu tlenku glinu. Straty enzymów przy tej metodzie rozdzielania są zawsze znaczne. Sposób ten nie jest odpowiedni do zastosowania na dużą skalę w procesach technicznych.

Stwierdzono obecnie, że proteinazy i karboksywielopeptydazy trypsyny dają się rozdzielić na podstawie własności ich rozpuszczalności, ponieważ proteinaza rozpuszcza się naogół łatwiej niż karboksywielopeptydaza. Do rozdzielania używa się znanych środków do strącania enzymów, jak np. acetonu, alkoholi lub nadających się do tego celu soli, np. siarczanu amonu. Przy zastosowaniu acetonu lub alkoholów

nadają się do tego celu najlepiej wodne roztwory tych rozpuszczalników o stężeniu, wynoszącym około 50%. Rozdzielenie to można z jednej strony przeprowadzić w ten sposób, że roztwory enzymów zadaje się środkami strącającymi aż do osiągnięcia pożądanego stężenia. Można naturalnie potępować i w ten sposób, że stałe mieszaniny enzymów wyciąga się zapomocą roztworów o wymienionem stężeniu. Proteinaza nagromadza się przytem w roztworach, podczas gdy karboksywielopeptydaza znajduje się w osadzie, względnie w pozostałościach nierozpuszczonych. Z wyżej wymienionych roztworów, w których nagromadziła się proteinaza, można otrzymać proteinazę w czystym stanie i postaci stałej, np. zapomocą strącania przez dodanie znanych środków strącających, jak np. acetonu, alkoholu i innych lub też zapomocą innych sposobów, nadających się do tego celu, jak np. zapomocą ostrożnego odparowania roztworu i ostrożnego suszenia otrzymanej pozostałości. Przy zastosowaniu odpowiednich warunków można już zapomocą jednorazowego strącania względnie rozpuszczania osiągnąć daleko idące rozdzielenie, które w razie potrzeby może być wykonane powtórnie. Przy tym sposobie pracy straty enzymów są nieznaczne tak, że sposób ten nadaje się do procesu technicznego na dużą skalę.

Jest rzeczą nadspodziewaną, że tak blisko z sobą spokrewnione enzymy jak proteinazy i karboksywielopeptydazy dają się oddzielić od siebie przez proste cząstkowe (frakcjonowane) traktowanie znanymi środkami do strącania enzymów.

Poszczególne enzymy, otrzymywane według sposobu niniejszego mogą, znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym.

Przykład I. 5%-owy wodny roztwór zupełnie zaktywowanej (t. j. w najwyższym stopniu czynnej) trypsyny (działalność której więc nie może być już więcej

podwyższona przez enterokinazę) zadaje się tą samą ilością objętościową acetonu. Powstały osad zawiera około 80% karboksywielopeptydazy i około 15 — 20% proteinazy. Osad ten wyosabnia się zapomocą przesączenia lub odwirowania i przerabia go zapomocą znanych sposobów na preparaty suche. Z ługów macierzystych wydzieła się największą część proteinazy (około 80% przez podwyższenie stężenia acetonu) prawie do 70% i otrzymuje się ją w sposób zwykły. Zawiera ona jeszcze małe ilości karboksywielopeptydazy. Przez powtórzenie tego procesu można przeprowadzić rozdzielenie jeszcze dokładniej.

W celu oznaczenia proteinazy metodą analityczną można posługiwać się jej zdolnością rozpuszczania żelatyny, a w celu określenia karboksywielopeptydazy — jej zdolnością rozkładania chlorowco-acylowanych kwasów aminowych, jak chloroacetylo-tyrozyny lub chloroacetylo-fenylalaniny, np. przez określanie uwolnionych grup aminowych sposobem van Slyke.

Przykład II. 10 części wagowych trypsyny poddaje się w ciągu jednej godziny działaniu 100 części wagowych wodnego roztworu, zawierającego 50%-ów objętościowych acetonu. Nierozpuszczalną część wyosabnia się zapomocą odsączenia lub odwirowania. Zawiera ona około 80% karboksywielopeptydazy obok nieznacznych ilości proteinazy. Proteinazę strąca się z ługów macierzystych przez dodanie równej ilości acetonu i otrzymuje się ją z wydajnością około 80%.

Przykład III. Wodny roztwór trypsyny zadaje się w celu strącenia 1,2 częściami objętościowymi *n*-alkoholu propylowego. Osad zawiera około 75% karboksywielopeptydazy; z oddzielonego od niej ługu pokrystalicznego otrzymuje się przez dodanie dwukrotnej ilości *n*-alkoholu propylowego proteinazę z wydajnością około 80%, zmieszaną z małą ilością karboksywielopeptydazy.

W wymienionych przykładach można aceton i alkohole zastąpić innemi odpowiedniemi środkami strącającemi lub wyciągającemi. Otrzymanie pozostałego w roztworze enzymu może odbywać się zamiast przez strącanie również przez suszenie zapomocą rozpylania lub zapomocą innych sposobów.

Zastrzeżenie patentowe.

Sposób rozdzielania proteinaz i karbo-

ksywielopeptydaz, znamienny tem, że mieszaniny obu enzymów poddaje się cząstkowej (frakcjonowanej) ekstrakcji albo strącaniu zapomocą rozpuszczalników lub soli, znanych jako środki do strącania enzymów.

Kalle & Co.
Aktiengesellschaft.
Zastępca: M. Skrzypkowski,
rzecznik patentowy.