



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

236 314

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 28 10 83
(21) PV 7979-83

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/48

(40) Zveřejněno 17 09 84
(45) Vydáno 01 01 88

(75)
Autor vynálezu

ŠAFAŘÍK IVO ing., SLANÝ,
VODRÁŽKA ZDENĚK doc.dr.ing. DrSc., PRAHA

(54)

Způsob izolace proteolytických enzymů

Izolace podle vynálezu se provádí adsorbci proteas na agar, do kterého je s výhodou zabudován ferromagnetický materiál. Eluce proteas se provádí roztoky anorganických solí, například síranem a chloridem sodným, draselným nebo amonným.

Vynález se týká způsobu izolace proteolytických enzymů.

Proteolytické enzymy se ze směsí /např. hrubé extrakty živočišných tkání nebo rostlinných pletiv, živná média po kultivaci produkčních mikroorganismů apod. /izolují celou řadou metod, například srážením síranem amonným nebo vhodnými organickými rozpouštědly, ultrafiltrací, ionexovou, geolovou a afinitní chromatografií a dalšími technikami. Významné místo mezi nimi zaujímá afinitní chromatografie, využívající specifických reverzibilních interakcí mezi vhodným ligandem, který bývá imobilizován na vhodném inertním nosiči, a izolovanou proteasou /Vesa, V.S.: Příkl. Biochim. Mikrobiol. 16, 629 /1980/; Lowe, C.R., Dean, P.D.G.: Afinitní chromatografie, SNTL Praha, 1979, str. 154/.

Jako typické příklady je možno uvést izolaci pepsinu na sloupci polylysin-Sepharosy 4B /Nevaldine, B., Kassell, B.: Biochim. Biophys. Acta 250, 207 /1971//, izolaci pankreatického trypsinu na ovomukoid-Spheronu /Turková, J., Seifertová, A.: J. Chromatogr. 148, 293 /1978// nebo izolaci proteas z listů ovsa na hemoglobin-Sepharose /Drivdahl, R.H., Thimann, K.: Plant Physiol. 59, 1059 /1977//.

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 se proteasy obsažené v roztoku adsorbují na agar. 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 je použití velmi dostupné suroviny /agaru/ a rovněž to, že se k izolaci používá agar bez jakékoli úpravy.

Vynález je dokumentován příklady použití.

Příklad 1

Skleněná kolona byla naplněna agarem rozptýleným ve vodě, přičemž byl vytvořen sloupec o rozměrech 200 x 12 mm. Po naplnění byla kolona promyta vodou, roztokem vhodné anorganické soli /např. NaCl, 1 mol.l⁻¹/ a opět vodou, dokud absorbance promyvů při 280 nm neklesly k nule. Potom bylo aplikováno 10 ml modelové směsi obsahující 10 mg trypsinu a 100 mg enzymového hydrolyzátu kaseinu ve vodě. Balastní bílkoviny byly z kolony vymyty vodou. Adsorbovaná proteasa byla z kolony eluována zvýšením iontové síly prostředí /elucí roztokem NaCl, 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 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 se měří absorbance supernatantu při 366 nm proti slepému vzorku. Linearita je zaručena do hodnoty absorbance 2.

Z celkově aplikované protealytické aktivity se s balastními bílkovinami při eluci vodou elovalo 6,5 % aktivity, při eluci roztokem chloridu sodného se v objemu 109,5 ml elovalo 90 % aktivity. Specifická aktivita trypsinu se po chromatografii zvýšila 20-krát.

Příklad 2

Za analogických podmínek jako v příkladu 1 /rozměr sloupce 210 x 12 mm/ byla provedena chromatografie 15 mg amorfního 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 vymylo 9,7 % aktivity, při eluci roztokem chloridu sodného /1 mol.l⁻¹/ se v objemu 114,5 ml

vymylo 86 % aktivity. Specifická aktivita trypsinu se po chromatografii zvýšila 2,2-krát.

Příklad 3

Za analogických podmínek jako v příkladu 1 /rozměr sloupce 170 x 12 mm/ byla provedena chromatografie 1 000 mg trypsinu ve 100 ml vody pro určení kapacity agaru. Po eluci nenavázaného trypsinu a balastních bílkovin vodou byl adsorbovaný trypsin eluován roztokem chloridu sodného /1 mol.l⁻¹/. Kapacita agaru je přibližně 1,8 mg čistého trypsinu na 1 ml sorbentu.

Příklad 4

Na sloupci agaru o rozměrech 220 x 12 mm byla izolována proteasa produkovaná 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 byly vymyty roztokem síranu amonného /1 mol.l⁻¹/. Z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami vymylo 18,3 % aktivity, při eluci roztokem síranu amonného se v prvních 73,5 ml eluentu vymylo 67,3 % aktivity a v celkovém objemu 168 ml se vymylo 74,8 % aktivity. Specifická aktivita proteasy se po chromatografii zvýšila 81-krát.

Analogické výsledky byly získány, když byl pro eluci adsorbovaných proteas použit roztok chloridu draselného /1 mol.l⁻¹/.

Příklad 5

Na sloupci agaru o rozměrech 220 x 12 mm byla provedena chromatografie kyselého vyčeřeného hovězího pankreatického extraktu. Extrakt byl před aplikací na kolonu 24 hod dialyzován proti tekoucí vodovodní vodě a potom nechán 24 hod při laboratorní teplotě, aby byla umožněna konverze trypsinogenu a chymotrypsinogenu na aktivní proteasy. Bylo aplikováno 6 ml roztoku, po eluci balastních bílkovin vodou byly adsorbované proteasy eluovány roztokem NaCl /1 mol.l⁻¹/. Z celkově aplikované proteolytické aktivity se s balastními bílkovinami vymylo 5,7 % aktivity, při eluci roztokem NaCl se v prvních 110 ml eluátu vymylo 90,6 % aktivity. Specifická aktivita proteasy se po chromatografii zvýšila 4,5-krát.

Příklad 6

238 314

Na sloupci agaru o rozměrech 250 x 12 mm byla provedena chromatografie surového preparátu papainu. Bylo aplikováno 5 ml vzorku obsahujícího 35 mg bílkoviny. Při chromatografii provedené jako v příkladu 1 se s balastními bílkovinami při eluci vodou vymylo 15 % aktivity, při eluci roztokem NaCl /1 mol.l⁻¹/ se v objemu 130 ml vymylo 80 % aktivity. Specifická aktivita se zvýšila po chromatografii 2,5-krát.

Příklad 7

Na sloupci agaru o rozměrech 200 x 12 mm byla provedena chromatografie 10 ml roztoku obsahujícího 15 mg amylasy. Preparát amylasy vykazoval proteolytickou aktivitu díky přítomnosti kontaminující proteasy. Při eluci vodou se z kolony vymyla téměř všechna amylasová aktivita /včetně balastních bílkovin/; proteolytické aktivity se vymylo 10 % z celkově aplikovaného množství. Při eluci roztokem síranu amonného /1 mol.l⁻¹/ se vymylo 85 % proteasové aktivity a pouze stopy amylasové aktivity.

Příklad 8

Ke 100 ml horkého /90 °C/ 5% roztoku agaru /rozvaření bylo provedeno v autoklávu/ bylo přidáno 10 g jemně rozemletého ferromagnetického materiálu a suspenze byla při laboratorní teplotě promíchávána tak dlouho, dokud agar neztuhl. Ztuhlý agar byl rozkrájen na menší kousky a protlačen přes kovové síto s průměrem ok 1 mm. Vytvořené granule byly sušeny v sušárně při teplotě 60 až 80 °C do konstantní hmotnosti. Takto připravený magnetický agar byl potom opakovaně suspendován ve vodě a roztoku NaCl /1 mol.l⁻¹/, dokud absorbance promyvů při 280 nm neklesla k nule. Při odlévání promývacích roztoků byl magnetický agar udržován v nádobě pomocí permanentního magnetu. Po promytí vodou byl agar připraven k použití.

Do baňky bylo k takto připravenému agaru přilito 100 ml roztoku, který obsahoval 20 mg trypsinu a 240 mg enzymového hydrolyzátu kaseinu. Suspenze byla 20 min třepána na rotační třepačce při teplotě 28 °C. Po sedimentaci agaru za pomoci magnetu byl supernatant odlit a potom byl sorbent promyt 300 ml vody. Dále byl

sorbent čtyřikrát po sobě promyt 50 ml roztoku NaCl /1 mol.l⁻¹/. Při všech promývacích operacích byl sorbent v kontaktu s promývací kapalinou po dobu 15 min.

Z celkově aplikované proteolytické aktivity se z modelového roztoku nenaadsorbovalo a vodou vymylo celkem 20 % aktivity. Roztokem NaCl se v celkovém objemu 200 ml vymylo celkem 50 % aktivity. Specifická aktivita trypsinu se po izolaci zvýšila 5,5-krát.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

236 314

1. Způsob izolace proteolytických enzymů, vyznačující se tím, že se proteasy obsažené v roztoku adsorbují na agar, jejich eluce se provádí roztoky anorganických solí s výjimkou solí, které ovlivňují enzymovou aktivitu, s výhodou sírany a chloridy sodnými, draselnými a amonnými.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se proteasy adsorbují na agar, do kterého je zabudován feromagnetický materiál.