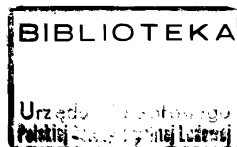


C12d 13/10



POLSKIEJ RZECZYPOSPOLITEJ LUDOWEJ OPIS PATENTOWY

Nr 40399

Kl. 30 h, 2/04

Akademia Medyczna w Warszawie *)
(Zakład Mikrobiologii i Higieny)

Warszawa, Polska

Sposób otrzymywania skoncentrowanej hialuronidazy z paciorkowca hemolizującego grupy C

Patent trwa od dnia 25 kwietnia 1957 r.

Hialuronidaza jest enzymem powodującym depolimeryzację wielocukru śluzowego, znanego pod nazwą kwasu hialuronowego. Wytwarzana jest ona zarówno przez organizmy zwierzęce jak i bakterie. W literaturze opisane są liczne sposoby otrzymywania hialuronidazy wytwarzanej przez bakterie. Do wytrącania enzymu stosuje się np. 4%-wy flawianat sodowy (J. Exp. Med. Vol. 171, 1940, 137) lub siarczan amonowy i alkohol etylowy (J. Bact. 1955, 70, 596). Znane jest również adsorbowanie hialuronidazy na dializowanym wodorotlenku żelazowym (Biochem. J. 40, 1945, 583). Wymienione metody mają tę wadę, że są mało wydajne i skomplikowane.

Sposobem według wynalazku można otrzymać hialuronidazę z wysoką wydajnością oraz bez stosowania skomplikowanych operacji. Sposób ten dotyczy otrzymywania hialuronidazy ze szczepu paciorkowca hemolizującego, należącego do grupy C, który nie posiada właściwości chorobotwórczych. Wymieniony szczep produkcyjny hoduje się na podłożu zawierającym wyciąg mięśnia sercowego, częściowo odbiałczony wyciąg wątrobowy, glukozę i sole mineralne. Według wynalazku w czasie fermentacji dodaje się do pożywki porcjami roztwór glukozy oraz 10%-wy roztwór dwuwęglanu sodowego, w celu utrzymania odczynu środowiska na poziomie $\text{pH} = 7,0$, przy czym całkowita ilość dodawanej glukozy wynosi 4% w stosunku do ilości pożywki. Dalszą istotną cechą wynalazku jest sposób oczyszczania hialuronidazy. Stwierdzono, że czysty produkt otrzymuje się wów-

*) Właściciel patentu oświadczył, że współtwórcami wynalazku są Roman Pakuła, mgr Henryk Osowiecki i mgr Irena Eysymontt.

czas, gdy frakcjonowane wysalanie hialuronidazy za pomocą siarczanu amonowego prowadzi się przy $\text{pH} = 6$, a liofilizację w środowisku fosforanowego związku buforującego przy $\text{pH} = 7,2$.

Przykład: 3000 ml podłoża produkcyjnego, składającego się z 2000 ml wyciągu mięśnia sercowego, 1000 ml wyciągu wątrobowego, częściowo odbiałczonego, 120 g peptonu bakteryjnego, 6 g chlorku sodowego i 1,2 g bezwodnego dwuzasadowego fosforanu potasowego, zadaje się 10%-owym ługiem sodowym, aż do osiągnięcia $\text{pH} = 7,0-7,2$. Całość sterylizuje się w autoklawie w ciągu 20–30 minut, przy nadciśnieniu $3/4$ atm. Oddzielnie przygotowuje się 240 ml sterylnej, 50%-ego roztworu glukozy, oraz sterylnej 10%-ego roztworu dwuwęglanu sodowego.

Do wysterylizowanej pożywki dodaje się 0,2% uprzednio przygotowanego roztworu glukozy oraz 10%-owy roztwór dwuwęglanu sodowego, aż do osiągnięcia $\text{pH} = 7,6$. Następnie szczepi się podłoże trzema kroplami 18-godzinnej hodowli szczepu produkcyjnego i umieszcza w ciepłarni w temperaturze 37°C . Od chwili kiedy bakterie zaczynają intensywnie i szybko rozmnażać się (po około 10 godzinach), dodaje się porcjami do środowiska pozostałą część roztworu glukozy (3,8%) oraz 10%-owy roztwór dwuwęglanu sodowego w takiej ilości, ażeby pH środowiska wynosiło 7,0.

Dla kontroli prawidłowego przebiegu fermentacji i narastania miana hialuronidazy, pobiera się z hodowli próbki w odstępach około 1-godzinnych i oznacza zawartość enzymu metodą turbidymetryczną.

Po około 18 godzinach hodowli, gdy środowisko nie ulega dalszemu zakwaszeniu i gdy następuje zahamowanie wzrostu bakterii, przejawiające się stałym poziomem miana hialuronidazy (około 100–120 jednostek turbidymetrycznych — TRU — na 1 ml podłoża), odwirowuje się bakterie na wirówce typu Alfa-Laval, a klarowny płyn fermentacyjny doprowadza do $\text{pH} = 6,0$, zadaje krystalicznym siarczanem amonowym do uzyskania 60%-ego nasycenia i odstawia na noc do chłodni. Powstały strąt hialuronidazy odsącza się przez 2–3 warstwy

bibuly na lejku Büchnera i rozpuszcza następnie w około 300 ml wody destylowanej. Otrzymany koncentrat hialuronidazy doprowadza się do $\text{pH} = 6,0$ i zadaje krystalicznym siarczanem amonowym (30%-owe wysycenie) w celu wytrącenia nieczynnych białek balastowych. Po oddzieleniu osadu na lejku Büchnera, koncentrat zadaje się po raz drugi krystalicznym siarczanem amonowym (60%-owe wysycenie) i pozostawia w chłodni (5°C) przez 10–12 godzin aż do wytrącenia się hialuronidazy. Wytrącony enzym odsącza się przez 2–3 warstwy bibuly na lejku Büchnera i zadaje 100 ml wody destylowanej. Tak otrzymany koncentrat poddaje się dializie w worku celofanowym (w temperaturze 5°C) wobec wody destylowanej. Po zaniku jonów NH_4^+ , koncentrat zakwasza się 10%-owym kwasem solnym do $\text{pH} = 5,5$ a wytrącone białka balastowe odwirowuje. Następnie koncentrat zadaje się fosforanowym związkiem buforującym z żelatyną do $\text{pH} = 7,2$. Otrzymany produkt po przesączeniu przez filtr Berkefelda, rozlewa się do fiolek i poddaje liofilizacji.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania skoncentrowanej hialuronidazy z paciorkowca hemolizującego grupy C na drodze fermentacyjnej, znamieny tym, że do pożywki doprowadza się porcjami roztwór glukozy, w ogólnej ilości 4% glukozy w stosunku do ilości pożywki, utrzymując pH podłoża na poziomie $= 7,0$ przez dodawanie 10%-ego roztworu dwuwęglanu sodowego, po czym po ukończonej fermentacji hialuronidazę poddaje się frakcjonowanemu wysoleniu i liofilizacji.
2. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że frakcjonowane wysalanie przeprowadza się za pomocą krystalicznego siarczanu amonowego przy $\text{pH} = 6,0$.
3. Sposób według zastrz. 1, znamieny tym, że liofilizację przeprowadza się w obecności buforującego związku fosforanowego przy $\text{pH} = 7,2$.

Akademia Medyczna w Warszawie
(Zakład Mikrobiologii i Higieny)