



Patent dodatkowy
do patentu

Zgłoszono: 17.V.1965 (P 109 137)

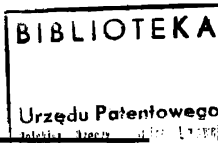
Pierwszeństwo:

Opublikowano: 15.IV.1966

Kl. 30 h, 2/10

MKP A-61-K
C 04 g 7/26

UKD



Współtwórcy wynalazku: Stefan Marcinkiewicz, Maria Budzyńska

Właściciel patentu: Instytut Farmaceutyczny, Warszawa (Polska)

Sposób wydzielania enzymów proteolitycznych z pozostałości trzustki po wyodrębnieniu insuliny

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wydzielania enzymów proteolitycznych z pozostałości gruczołu trzustkowego po wyodrębnieniu insuliny. Otrzymane enzymy nadają się do stosowania w przemyśle, np. w garbarstwie, a wydzielone w stanie wysokiej czystości nadają się zwłaszcza do celów terapeutycznych.

Na temat wydzielania enzymów proteolitycznych trzustki, a zwłaszcza na temat wykorzystania do tego celu materiału odpadowego, którym jest pozostałość trzustki po wyodrębnieniu insuliny, istnieje obszerna literatura patentowa. Insulinę wyodrębnia się przez traktowanie rozdrobnionej trzustki alkoholowymi roztworami kwasów. Insulina przechodzi do roztworu, a równocześnie następuje osadzanie i zdezaktywowanie enzymów proteolitycznych. W celu uzyskania tych enzymów o przywróconej aktywności, znany jest sposób traktowania pozostałości bardzo dużymi ilościami wody. Woda przede wszystkim usuwa kwas i alkohol, a następnie rozpuszcza pewną ilość tych enzymów. Z bardzo rozcieńczonego roztworu wodnego, enzymy wysala się chlorkiem sodowym, co pochłania wielkie ilości soli. Znane jest również zagęszczenie rozcieńczonego roztworu wodnego pod obniżonym ciśnieniem, a następnie wysalanie enzymów z mniejszej objętości roztworu zagęszczonego.

Znane są także i inne sposoby polegające na

2

ekstrakcji pozostałości trzustki rozpuszczalnikami organicznymi mieszającymi się z wodą i wydzielanie enzymów z tych ekstraktów. Wydajność znanych sposobów jest bardzo niewielka, a postępowanie kłopotliwe. Nieco lepszą wydajność uzyskuje się innym znanym sposobem polegającym na wstępnym ogrzaniu pozostałości po wydobyciu insuliny przed ekstrakcją do temperatury 100° pod warunkiem, że czas ogrzewania jest bardzo krótki. Warunek ten jest trudny do realizacji w skali przemysłowej, co praktycznie sposób ten dyskwalifikuje.

Próby stosowania różnych znanych sposobów wykazały, że można otrzymać z 1 kg pozostałości najwyżej 5 g preparatu o aktywności około 10.000 jednostek Fuld-Grossa, czyli można ogółem uzyskać około 50.000 tych jednostek.

Pozostałość po wyodrębnieniu insuliny jak również nieekstrahowany rozdrobniony gruczoł trzustkowy dzięki zawartości enzymów proteolitycznych mają skłonność do autolizy. Stwierdzono, że autolizaty te można bez trudności ekstrahować, zapewne na skutek zniszczenia pierwotnej struktury żywej tkanki. Ponadto autoliza przywraca aktywność enzymom zdezaktywowanym podczas wyodrębniania insuliny alkoholowym roztworem kwasu.

Przeprowadzone próby ekstrakcji autolizatu otrzymanego z pozostałości po wyodrębnieniu insuliny, w których zastosowano różne rozpuszczal-

niki, wykazały że nie jest słuszne dążenie do wyekstrahowania enzymów proteolitycznych z autolizatu, lecz raczej należy ekstrakcję nastawić na usunięcie jak największej ilości innych substancji z pozostawieniem możliwie jak największej ilości enzymów proteolitycznych. Jakkolwiek pewna ilość enzymów nieuchronnie przejdzie do ekstraktu, można uzyskać pozostałość poekstrakcyjną, stanowiącą koncentrat enzymów o wielkiej aktywności proteolitycznej. Koncentrat ten może być stosowany bezpośrednio, albo może służyć jako półprodukt do uzyskania zespołu enzymów proteolitycznych w stanie wysokiej czystości.

Według wynalazku materiał wyjściowy t.j. pozostałość po wyodrębnieniu insuliny z rozdrobnionej trzustki należy uwolnić od alkoholu i co najmniej większej części kwasu przy możliwie jak najmniejszym wyekstrahowaniu z tego materiału enzymów proteolitycznych. W tym celu przemycza się ten materiał niewielką ilością wody lub rozpuszczalnika organicznego mieszającego się z wodą, jak octan etylu, octan metylu, aceton, a pozostałe kwasy neutralizuje, zwłaszcza amoniakiem. Tak wstępnie przygotowany materiał pozostawia się w temperaturze pokojowej, lub zbliżonej do niej, na przeciąg kilku dni w celu przeprowadzenia autolizy. Ponieważ jak się okazało, autoliza tego materiału ma charakter procesu autokatalitycznego t.j. szybkość jej wzrasta w miarę postępu procesu, korzystne jest, aczkolwiek niekonieczne, dodawanie do substancji przeznaczonej do autolizy autolizatu trzustki. Tą drogą pobudza się autolizę i przyspiesza jej przebieg np. do 2 dni.

Autolizat poddaje się następnie ekstrakcji rozpuszczalnikami mieszającymi się z wodą jak alkohole rozpuszczalne w wodzie, estry kwasów organicznych lub ketony. Rozpuszczalniki te usuwają z autolizatu tłuszcze, wodę i znaczną część rozmaitych produktów autolizy, a stosunkowo niewielką ilość enzymów proteolitycznych. Po ekstrakcji pozostaje preparat białkowy, który po wysuszeniu wykazuje wysoką aktywność proteolityczną wynoszącą 15.000-30.000 jednostek Fuld-Grossa w 1 g preparatu wysuszonego. Wobec tego preparat ten stanowi koncentrat enzymów proteolitycznych.

Wydaźność procesu wydzielania enzymów proteolitycznych z pozostałości po wyodrębnieniu insuliny wyrażona w jednostkach Fuld-Grossa jest rzędu wielkości 10^7 z 1 kg, a więc rzędu znacznie wyższego niż wydaźność osiągana sposobami znanymi.

Drogą dalszej ekstrakcji tego produktu można z niego wydzielić zespół enzymów proteolitycznych o bardzo wielkiej czystości i aktywności. Ekstrakcję tę prowadzi się według wynalazku, wodnymi roztworami organicznymi rozpuszczalników mieszających się z wodą a zwłaszcza wodnym roztworem octanu etylu. Z ekstraktu przez dodanie organicznego rozpuszczalnika, np. octanu etylu lub przez wysolenie, wytrąca się substancja białkowa stanowiąca zespół enzymów proteolitycznych o aktywności 90-120.000 jednostek Fuld-Grossa w 1 g. Tak wyodrębniony i oczyszczony zespół enzymów pro-

teolitycznych nadaje się zwłaszcza do celów terapeutycznych.

Przykład I. 50 g wolnej od insuliny pozostałości gruczołu trzustkowego, zawierającej 35% suchej substancji, przemycza trzykrotnie 100 ml wody. Po odwirowaniu ostatniej porcji wody zebrano wilgotną pozostałość i dodano do niej 25 procentowy roztwór wodny amoniaku aż do otrzymania $pH = 7$. Następnie dodano 5 g trzustki wieprzowej, która była autolizowana w ciągu 3 dni w temperaturze $5^{\circ}C$. Otrzymaną w ten sposób mieszaninę starannie zmieszano w homogenizatorze i pozostawiono w temperaturze $20^{\circ}C$ przez 2 dni. Następnie dodano 100 ml octanu etylu i po starannym wymieszaniu dodano 100 ml etanolu. Mieszaninę starannie wymieszano i pozostawiono na 2 godziny a następnie odsączono. Pozostałość przemycza 50 ml octanu etylu i odsączono, a następnie pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej. Otrzymany w ten sposób preparat utarto w moździerzu. Preparat ważył 7,8 g. Jego aktywność proteolityczna wynosiła około 25.000 jednostek Fuld-Grossa w jednym gramie preparatu.

Przykład II. 50 g wolnej od insuliny pozostałości gruczołu trzustkowego, zawierającej 37 g suchej substancji, przemycza dwukrotnie 100 ml acetonu, odsączono i wysuszono w temperaturze pokojowej. Suchą substancję zmieszano z 50 ml wody, dodano 25 procentowy roztwór amoniaku aż do $pH = 7$ oraz 5 g trzustki wieprzowej, która była autolizowana w ciągu trzech dni w temperaturze $5^{\circ}C$ i całość wymieszano w homogenizatorze, a następnie pozostawiono na dwa dni w temperaturze $20^{\circ}C$. Po upływie tego czasu do autolizatu dodano 100 ml acetonu, odsączono, dodano 50 ml acetonu i 50 ml eteru, odsączono, dodano 50 ml eteru i odsączono, a pozostałość wysuszono w temperaturze pokojowej i utarto w moździerzu. Otrzymany w ten sposób preparat ważył 11 g. Jego aktywność proteolityczna wynosiła około 20.000 jednostek Fuld-Grossa w jednym gramie preparatu.

Przykład III. 5 g preparatu enzymów proteolitycznych, otrzymanego według przykładu I, zmieszano z 25 ml 25 procentowego roztworu wodnego etanolu, w temperaturze $20^{\circ}C$ w ciągu 1 godziny, a następnie przesączono. Do przesączu dodano 75 ml etanolu i pozostawiono na dwie godziny, następnie odwirowano wytrącone białka, przemycza je eterem i wysuszono w temperaturze pokojowej. Otrzymany w ten sposób preparat ważył 0,47 g. Jego aktywność proteolityczna wynosiła około 120.000 jednostek Fuld-Grossa w jednym gramie preparatu.

Przykład IV. 5 g preparatu enzymów proteolitycznych, otrzymanego według przykładu II, zmieszano z 25 ml wody w ciągu 1 godziny w temperaturze $20^{\circ}C$, a następnie przesączono. Do przesączu dodano 50 ml acetonu i pozostawiono na 2 godziny, a następnie odsączono wytrącone białka, przemycza je eterem i wysuszono w temperaturze pokojowej. Otrzymany w ten sposób preparat ważył 0,53 g. Jego aktywność proteolityczna wynosiła około 90.000 jednostek Fuld-Grossa w jednym gramie preparatu.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wydzielania enzymów proteolitycznych z pozostałości trzustki po wyodrębnieniu insuliny, **znamienny tym**, że pozostałość przemywa się małą ilością wody lub rozpuszczalnika organicznego jak octan etylu, octan metylu, aceton, w celu usunięcia alkoholu i większej części kwasu, następnie zubożętnia się zwłaszcza amoniakiem i poddaje autolizie przez pozostawienie w temperaturze pokojowej w przeciągu kilku dni, następnie autolizat ekstrahuje się rozpuszczalnikiem mieszającym się z wodą lub mieszaniną takich rozpuszczalników jak alkohole rozpuszczalne w wodzie, estry kwasów organicznych lub ketony, a pozostałość po ekstrakcji, sta-

- nowiącą koncentrat enzymów proteolitycznych albo suszy się, albo poddaje dalszej ekstrakcji.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że w celu zapoczątkowania i przyspieszenia autolizy dodaje się do substancji poddawanej autolizie autolizat trzustki.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że koncentrat poddaje się dalszej ekstrakcji wodnymi roztworami organicznych rozpuszczalników, a zwłaszcza roztworem octanu etylu, a z otrzymanego ekstraktu wytrąca się substancję białkową stanowiącą zespół enzymów proteolitycznych przez dodanie do roztworu rozpuszczalnika organicznego lub przez wyso-