

Použitie ionexovej chromatografie pri purifikácii enzýmu

KATARÍNA JANEKOVÁ – JUDITA HORVÁTHOVÁ – BOHUMÍR SABO

Súhrn. Článok uvádza súhrn o charakterizácii a možnostiach purifikácie československého potravinárskeho alfa-amylázového preparátu metódou dialýzy a ionexovej chromatografie.

Použitý preparát obsahuje 20 % látok bielkovinovej povahy, z ktorých polovica nevykazuje enzýmovú aktivitu a možno ich oddeliť dialýzou. Pomocou ionexovej chromatografie sme dosiahli 33,8, resp. 42-násobné zvýšenie špecifickej aktivity enzýmu.

Alfa-amyláza (EC 3.2.1.1) je 1,4- α -D-glukan glukanyhydroláza, ktorá hydrolyzuje polysacharidy za vzniku dextrínov a oligosacharidov [1, 2].

Mikrobiálnu alfa-amylázu pre priemyselné účely produkujú kultúry baktérií a plesní. Široké uplatnenie nachádza pri vhodnej čistote vzhľadom na vybratý potravinársky technologický proces, resp. na požiadavky kladené na výrobu napr. v škrobárenskom alebo pivovarníckom priemysle. Špecifické vlastnosti alfa-amylázy využívajú aj iné odvetvia priemyslu (papierenský, textilný).

V ČSSR bola overená príprava technického preparátu alfa-amylázy z *Bacillus subtilis* a príprava potravinárskeho preparátu v práškovej forme. Spôsob prípravy potravinárskej Bolamylázy sa zakladá na alkoholovom zrážaní bielkovinovej frakcie tekutého podielu na odstránení biomasy. Vedie k vytvoreniu viacložkového bielkovinového komplexu vykazujúceho nielen alfa-amylázovú aktivitu. V tomto komplexe sa nachádzajú bielkoviny širokého spektra iónových vlastností a molekulových hmotností.

Ing. Katarína Janeková, Ing. Bohumír Sabo, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

Judita Horváthová, Katedra chémie a technológie sacharidov a potravín, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Cieľom našej práce bolo bližšie charakterizovať potravinársku alfa-amylázu, prípadne ju využiť ako základný preparát na prípravu čistejšieho enzymatickeho produktu vhodného na špecifické účely.

V súlade s modernými trendmi použitia priemyselných chromatografických systémov pri príprave čistých enzýmových preparátov sa na základe uvedených skutočností v práci použila metóda ionexovej chromatografie a dialýza (ako predseparačná metóda na oddelenie nízkomolekulových bielkovín). Uvedené spôsoby predstavujú prvé kroky purifikácie enzýmu z celého komplexu postupu čistenia.


Materiál a metódy

V experimentálnej práci sme na purifikáciu použili československý enzýmový preparát potravinárskej práškovej alfa-amylázy z *Bacillus subtilis* zakotvenej na sieťovanom škrobovom nosiči. Enzým spĺňa kritériá PN 754 212/2-79 [3], vyrobili ho v Slovenských škrobárňach a liehovaroch Trnava, závod Dolná Krupá a vykazoval aktivitu 4500 DA.g⁻¹.

Postup purifikácie enzýmu s podmienkami pokusu znázorňuje schéma 1

Stanovenie bielkovín. Koncentrácia bielkovín vo vzorke sa určila stanovením absorbie aromatických a heterocyklických aminokyselín prítomných v bielkovinových molekulách metódou UV spektroskopie (280 nm) na prístroji Spektromom 195 D. Vzorky sa merali v 1-cm kyvetách oproti sodnofosfátovému, tlmivému roztoku (vzhľadom na prostredie vzorky). Koncentrácia bielkoviny sa odčítala z kalibračnej krivky závislosti absorbie od koncentrácie štandardnej vzorky alfa-amylázy – Alpha-Amylase Rohalase A3 *B. subtilis* (Serva).

Stanovenie aktivity alfa-amylázy. Použila sa metóda založená na zmene farby spôsobenej rozkladom jódoškrobového komplexu a následnou reakciou jódu s hydrolytickými štiepnymi produktmi škrobu.

-
- 
- 1 – sample: purified alpha-amylase
 - 2 – centrifugation
 - 3 – sediment
 - 4 – supernatant
 - 5 – dialysis
 - 6 – diffused substance
 - 7 – application of the sample on column
 - 8 – column abluion by buffer solution (50ml)

vzorka: alfa-amyháza purifikovaná¹



centrifugácia²



supernatant⁴

dialýza⁵



nanesenie vzorky na kolónu⁷



premyvávanie kolóny tlmivým roztokom
(50 ml)⁸



nanesenie lineárneho
gradientu NaCl⁹



separované frakcie¹⁰

1–10 g/100 ml sodnofosfátového tlmivého
roztoku koncentrácie
 $c = 0,002 \text{ mol.dm}^{-3}$ ¹¹

10 min pri 2000 ot./min¹²

24–96 hodín;
stanovenie bielkovín¹³

18–73 ml dialyzátu¹⁴
výška náplne: 20 cm
parametre kolóny: 0,9 × 60 cm

$c_{(\text{NaCl})} = 0-0,15 \text{ mol.dm}^{-3}$
 $0-0,3 \text{ mol.dm}^{-3}$
 $0-0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$
 0 –nasýtený roztok¹⁵
objem gradientu: 2 × 100 ml

stanovenie bielkovín, enzýmovej aktivity¹⁶

S c h é m a 1. Postup purifikácie enzýmu Bolamylázy
S c h é m e 1. Purification procedure of the enzyme Bolamyláza.

9 – application of linear gradient of NaCl

10 – separated fractions

11 – 1–10 g/100 ml natrium-phosphate buffer solution (concentration $c = 0,002 \text{ mol.dm}^{-3}$)

12 – 10 min. at rev./min.

13 – 24 – 96 hours; protein determination

14 – 18–73 ml of dialyzate, packing height: 20 cm, column dimensions: 0,9 × 60 cm

15 – saturated solution, volume of gradient: 2 × 100 ml

16 – protein determination, enzyme activity

Postup: Do 5 ml 1 % škrobového roztoku (rozpuštný škrob podľa Leulier) po inkubácii pri 37 °C 10 min sa pridalo 0,5 ml enzýmu a znova inkubovalo pri tých istých podmienkach. Reakciu sme zastavili pridaním 5 ml HCl koncentrácie 0,1 mol.dm⁻³. 0,5 ml z tejto zmesi sa pridalo do 5 ml jódového roztoku (500 mg I₂ a 5 g KI na 100 ml destilovanej vody a reagensiu sme ešte riedili 100-krát). Intenzita vzniknutého modrého zafarbenia sa merala v 1-cm kvetách oproti slepému pokusu, ktorý neobsahoval ani enzým ani substrát, pri vlnovej dĺžke 620 nm na prístroji Spekol 11 [4]. Alfa-amylázová aktivita enzýmu vyjadrená v U.ml⁻¹, resp. prepočtom 1 U = 16,67 nkat sa vypočítala podľa vzorca

$$a[U/ml] = D[(R_0 - R)/R_0] 100,$$

kde R_0 je absorbancia jódoškrobového roztoku bez prítomnosti enzýmu, R – rozdiel absorbancií slepého pokusu a vzorky, D – riedenie.

Stanovenie aktivity glukooamylázy. Použila sa metóda podľa Somogyiho [5], založená na enzymatickom štiepní substrátu a stanovení štiepneho produktu – glukózy.

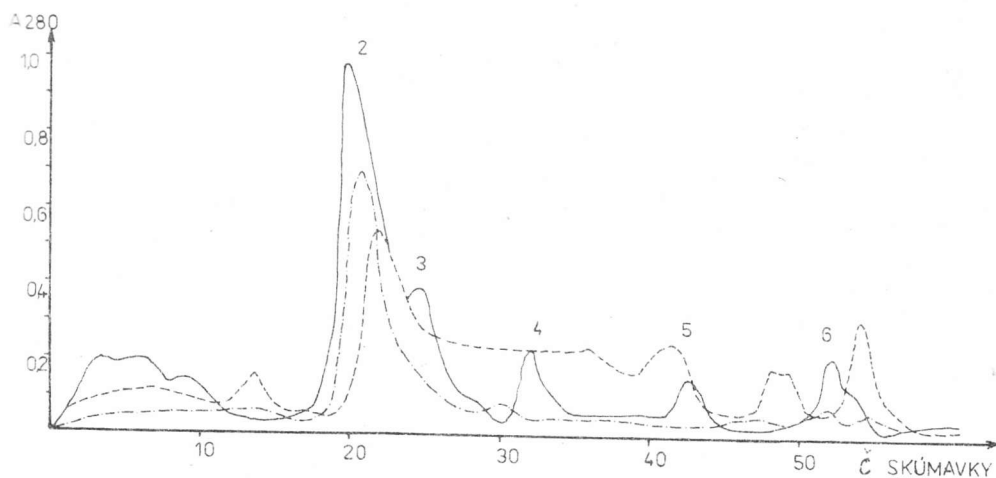
Dialýza. Dialyzačné vrecká firmy SERVA – Servapor 29 mm, naplnené vzorkou a uzavreté sme vložili do banky s destilovanou vodou a nútenou cirkuláciou za pomoci magnetického miešadla. Tento proces prebiehal v rôznych časových intervaloch. Vysoký koncentračný gradient zabezpečovala výmena destilovanej vody približne po 8 hodinách. Dialyzačná voda a dialyzovaná vzorka sa ďalej charakterizovali.

Ionexová chromatografia sa robila na kolóne C9 firmy Pharmacia rozmerov 0,9 x 60 cm, ktorá bola naplnená ionexom OSTSORB DEAE do výšky 20 cm, vopred nastavenom na požadovaný cyklus [3]. OSTSORB DEAE je modifikovaná perlová celulóza s funkčnou dietylénaminoetylénovou skupinou a pracovným rozsahom pH 2-14, s minimálnou kapacitou 1,1 mmol.g⁻¹ [6]. Vzorka a ostatné roztoky sa aplikovali na kolónu pomocou čerpadla rýchlosťou 1 ml.min⁻¹ a zberali zberačom frakcií po 5 ml.

Výsledky a diskusia

V našej práci sme použili supernatant enzýmového preparátu, ktorý sme získali rozpustením 5 g enzýmu v 100 ml tlmivého roztoku a nasledujúcou centrifugáciou. Na ionexovú kolónu sme naniesli 18 ml takto získaného roztoku a na elúciu sme použili tlmivý roztok a potom lineárny gradient NaCl, ako vidieť na schéme 1. Získaný chromatogram vyjadrujúci závislosť absorbancie pri 280 nm od vytečeného objemu roztoku je na obrázku 1. Ako je z

chromatogramu zrejme, v relatívnom pomere 14 % bielkoviny vyteká pred nasadením gradientu, pričom gradient vytesňuje z ionexu ďalšie 4 frakcie (86 %).



O b r. 1. Chromatografické záznamy pokusov s použitím lineárnych gradientov NaCl rôznych koncentrácií. Jedna skúmavka obsahuje 5 ml eluátu, lineárny gradient je nasadený od skúmavky č. 19.

— $c_{(\text{NaCl})} = 0 - 0,15 \text{ mol.l}^{-1}$, — $c_{(\text{NaCl})} = 0 - 0,3 \text{ mol.l}^{-1}$, — · — $c_{(\text{NaCl})} = 0 - 0,5 \text{ mol.l}^{-1}$.

F i g. 1. Chromatograms from experiments with linear NaCl gradients of different concentrations. One test tube contains 5 ml of eluate, linear gradient starts from test tube 19.

Na základe získaných výsledkov sme sa rozhodli zaradiť pred ionexovú chromatografiu úpravu vzorky dialýzou a zároveň zvýšiť koncentráciu základného preparátu z 5 g na 10 g na 100 ml tlmivého roztoku. Dialýza enzýmového preparátu prebiehala v časových intervaloch 24 – 96 hodín, pričom, ako vidieť z tabuľky 1, optimálny čas dialýzy vzhľadom na distribúciu bielkovín získanú ionexovou chromatografiou sa pohybuje okolo 40 – 50 hodín, čo sme stanovili na základe pomeru absorbancií píku 2 a 1. Ďalšie predlžovanie času už podstatne nevyplýva na účinnosť dialýzy. Zmena koncentrácie jednotlivých frakcií bielkovín po nasledujúcej ionexovej chromatografii udáva pravdepodobne nehomogenita a rôzna rozpustnosť alfa-amylázového preparátu. Z výsledkov je zrejme, že dialýza neovplyvňuje pomerné zastúpenie frakcií (hlavne pík 2 a 3 v tab. 1). Ako vidieť z tabuľky 2, dochádza približne k 50 % oddeleniu rozpustných bielkovín z dialyzovanej vzorky.

Ako ďalšiu separačnú operáciu po dialýze sme použili ionexovú chromatografiu. Pri ionexovej chromatografii nedialyzovaného a dialyzovaného prepa-

Tabuľka 1. Porovnanie pokusov dialýzy v závislosti od navážky a času ionexovou chromatografiou
Table 1. Comparison of dialysis experiments in dependence on the sample weight and time by ion-exchange chromatography

Návažok ¹	Objem vzorky na kolóne ²	Čas dialýzy ³	Pík ⁴ 1	Pík 2	Pík 3 Amax	Pík 4	Pík 5	Pík 6
[g/100 ml]	[ml]	[h]						
5	18	24	0,100	0,333	0,040	0,034	0,042	–
5	18	64,5	0,031	0,432	0,026	–	–	–
5	27	92	0,049	0,696	0,058	0,035	–	–
10	36	70	0,199	0,982	0,218	0,135	0,206	–
10	73	46,5	0,071	0,643	0,096	–	–	–
10	31	44	0,142	0,925	0,103	0,036	0,037	–
10	73	72	0,512	2,604	0,351	0,195	0,228	0,298

Označenie píkov zodpovedá obrázku 1.

Designation of peaks as in Fig. 1.

¹Sample weight; ²Sample volume of column; ³Dialysis time; ⁴Peak.

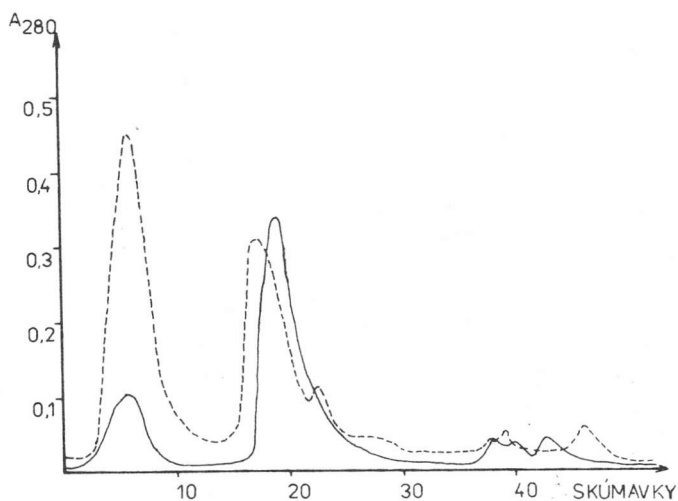
Tabuľka 2. Obsah bielkovín v dialyzačnej vzorke a difuzáte
Table 2. Protein contents in dialysis sample and in the diffuseate

Návažok ¹ [g.ml ⁻¹]	Supernatant ²		Dialyzovaná vzorka ³		I. difuzát ⁴		II. difuzát ⁵	
	objem ⁶ [ml]	C _{bielk.} ⁷ [mg.ml ⁻¹]	objem [ml]	C _{bielk.} ⁷ [mg.ml ⁻¹]	objem [ml]	C _{bielk.} ⁷ [mg.ml ⁻¹]	objem [ml]	C _{bielk.} ⁷ [mg.ml ⁻¹]
5/50	34	663	31	348,8	800	144	800	184

¹Sample weight; ²Supernatant; ³Dialysed sample; ⁴Ist diffusate; ⁵Ind diffusate; ⁶Volume; ⁷C_{prot.}

rátu sme zistili podstatný rozdiel chromatografického záznamu pred použitím gradientu. Vo vzorke sa po dialýze výrazne znížila odozva absorbancie na prítomnosť bielkovín. Chromatografický záznam oblasti po nasadení gradientu NaCl sa dialýzou ovplyvnil iba veľmi málo, ako vidieť z obrázku 2.

Pri skúšaní rôznych koncentrácií gradientu sme nepozorovali významnejší rozdiel v posune jednotlivých pásov chromatogramu. Na základe dosiahnutých výsledkov, ako vidieť na obrázku 1, možno napriek tomu konštatovať, že z použitých lineárnych gradientov NaCl koncentrácií $c_{(\text{NaCl})} = 0 - 0,15$; $0 - 0,3$; $0 - 0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$ a 0-nasýtený roztok NaCl je optimálny gradient $c_{(\text{NaCl})} = 0 - 0,3 \text{ mol.dm}^{-3}$, pri ktorom sa dosiahlo najlepšie rozdelenie aj pri najvyššej použitej koncentrácii 10 g/100 ml zo základnej vzorky.



O b r. 2. Chromatografický záznam dialyzovanej a nedialyzovanej vzorky.

———— dialyzovaná vzorka, — — — nedialyzovaná vzorka.

F i g. 2. Chromatograms of dialysed and non-dialysed samples.

———— dialysed sample, — — — non-dialysed sample.

Významným údajom o deliacej schopnosti použitých separačných metód a zároveň čistote preparátu je hodnota špecifických aktivít jednotlivých eluovaných frakcií. Zistilo sa, že alfa-amylolytickú aktivitu vykazujú vzorky eluované z kolóny ako pík 1 a 2 po nasadení gradientu (t.j. pík 2 a 3 na obr. 3). Pri ostatných frakciách sme nezistili alfa-amylolytickú aktivitu. Pri výpočte špecifickej aktivity východiskového supernatantu pred dialýzou píku 2 a 3 (obr. 1) sme získali tieto hodnoty: $79,51 \text{ nkat.mg}^{-1}$, $2688,871 \text{ nkat.mg}^{-1}$, resp. $3547,37 \text{ nkat.mg}^{-1}$, čo predstavuje 33,8, resp. 44,6-násobné zvýšenie špecifickej aktivity oproti východiskovej vzorke. Glukoamyláza bola na veľmi nízkej až nereprodukovateľnej úrovni okrem 3. signálu po nasadení gradientu (t. j. pík 4 na obr. 3).

Na základe zistených skutočností sa javia dialýza a ionexová chromatografia ako vhodné predpurifikačné metódy ďalšieho čistenia vzorky gélovou filtráciou.

Literatúra

1. Specifications for Identity and Purity. FAO Food and Nutrition Paper no. 19. Rome 1981, s. 229-232.
2. KVESTITADZE, G. I.: Gribnyje i bakterialnyje amylazy. Tbilisi, Mecniereva 1984, 154 s.

3. PN 754 212/2-79. Potravinárska bolamyláza.
4. YOUNG, J. Y., *Biotechnol. Bioeng.* 30, 1987, s. 147-151.
5. SOMOGYI, N., *J. Biol. Chem.*, 195, 1952, s. 19-22.
6. Firemná literatúra koncernu Chemopetrol. Perlóza. Nepredajná účelová publikácia. Praha, Tomos 1988, 23 s.

Do redakcie došlo 4. 7. 1989

Применение ионообменной хроматографии при очистке энзима

Резюме

Статья представляет обзор познаний об характеристике и возможностях очистки чехословацкого пищевого альфа-амилазового препарата методом диализа и ионообменной хроматографии.

Примененный препарат содержит 20 % веществ белкового характера, из которых половина не показывает энзимную активность и есть возможность их отделения диализом. При помощи ионообменной хроматографии мы получили повышение специфической активности энзима в 33,8 и также 42 раз.

Utilization of ion-exchange chromatography for enzyme purification

Summary

The paper presents a summary of informations on the characterization and possibilities of purification of Czechoslovak alpha-amylase preparation by dialysis and ion-exchange chromatography.

The preparation contains 20 % compounds of protein character, half of which do not show any enzyme activity. These can be separated by dialysis. By ion-exchange chromatography, a 33.8-fold or 42-fold increase of specific activity of the enzyme has been achieved.