

## **Získání enzymů**

- zdroje enzymů
- izolace a purifikační postupy
- uchovávání a stabilizace
- komerční dodavatelé
- studium struktury

## **Zdroje enzymů**

- enzym lze získat z jakéhokoli organismu
- z cca 100 enzymů používaných průmyslově pochází přes 50% z plísní a kvasinek, 30% z bakterií, 8% z živočichů a 4% z rostlin
- proč se preferují mikrobiální zdroje
  - levnější produkce
  - lepší kontrola a předpověditelnost obsahu enzymu
  - snazší získání surového materiálu o konstantním složení
  - v živočišném a rostlinném materiálu je více škodlivých složek (proteasy, inhibitory, fenolické složky)
- snahy o zlepšení použitím tkáňových kultur

## Nejběžnější enzymy

+++ > 100; ++ > 10; + > 1; - < 1 tun/rok

Enzym	EC číslo	Zdroj	Intra / extra cel.	Rozsah produkce	Použití
<b>živočišný původ</b>					
katalasa	1.11.1.6	játra	I	-	potraviny
chymotrypsin	3.4.21.1	pankreas	E	-	kůže
lipasa	3.1.1.3	pankreas	E	-	potraviny
syřidlo	3.4.23.4	žaludek telat (slez)	E	+	sýry
trypsin	3.4.21.4	pankreas	E	-	kůže
<b>rostlinný původ</b>					
aktinidin	3.4.22.14	kiwi	E	-	potraviny
$\alpha$ -amylasa	3.2.1.1	slad	E	+++	pivo
$\beta$ -amylasa	3.2.1.2	slad	E	+++	pivo
bromelain	3.4.22.4	ananasový latex	E	-	pivo
b-glukanasa	3.2.1.6	slad	E	++	pivo
ficin	3.4.22.3	fikovníkový latex	E	-	potraviny
lipoxygenase	1.13.11.12	sojové boby	I	-	potraviny
papain	3.4.22.2	papájový latex	E	++	maso

## Nejběžnější enzymy

Enzym	EC číslo	Zdroj	Intra / extra cel.	Rozsah produkce	Použití
<b>bakteriální</b>					
$\alpha$ -amylasa	3.2.1.1	<i>Bacillus</i>	E	+++	škrob
$\beta$ -amylasa	3.2.1.2	<i>Bacillus</i>	E	+	škrob
asparaginasa	3.5.1.1	<i>Escherichia coli</i>	I	-	zdravotnictví
glukosaisomerasa	5.3.1.5	<i>Bacillus</i>	I	++	fruktosový sirup
penicilinamidasa	3.5.1.11	<i>Bacillus</i>	I	-	léčiva
proteasa	3.4.21.14	<i>Bacillus</i>	E	+++	detergenty
pullulanasa	3.2.1.41	<i>Klebsiella</i>	E	-	škrob
<b>z kvasinek</b>					
invertasa	3.2.1.26	<i>Saccharomyces</i>	I/E	-	sladkosti
laktasa	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces</i>	I/E	-	mléčné produkty
lipasa <sup>z</sup>	3.1.1.3	<i>Candida</i>	E	-	potraviny
rafinasa <sup>z</sup>	3.2.1.22	<i>Saccharomyces</i>	I	-	potraviny

## Nejběžnější enzymy

Enzym	EC číslo	Zdroj	Intra / extra cel.	Rozsah produkce	Použití
z plísní					
$\alpha$ -amylasa	3.2.1.1	<i>Aspergillus</i>	E	++	pečení
aminoacylase	3.5.1.14	<i>Aspergillus</i>	I	-	léčiva
glukoamylasa	3.2.1.3	<i>Aspergillus</i>	E	+++	škrob
katalasa	1.11.1.6	<i>Aspergillus</i>	I	-	potraviný
celulasa	3.2.1.4	<i>Trichoderma</i>	E	-	odpady
dextranasa	3.2.1.11	<i>Penicillium</i>	E	-	potraviný
glukosaoxidasa	1.1.3.4	<i>Aspergillus</i>	I	-	potraviný
laktasa	3.2.1.23	<i>Aspergillus</i>	E	-	mléčné produkty
lipasa	3.1.1.3	<i>Rhizopus</i>	E	-	potraviný
syřidlo	3.4.23.6	<i>Mucor miehei</i>	E	++	sýry
pektinasa	3.2.1.15	<i>Aspergillus</i>	E	++	nápoje
pektinylasa	4.2.2.10	<i>Aspergillus</i>	E	-	nápoje
proteasa	3.4.23.6	<i>Aspergillus</i>	E	+	pečení
rafinasa	3.2.1.22	<i>Mortierella</i>	I	-	potraviný

## Výroba enzymů

- převládá několik mikrobů, dlouho známé a používané, produkce optimalizována mutací a selekcí
- přednostně extracelulární a konstitutivní
  - event. levná a rychlá indukce
- bezpečné kmeny, vysoká produkce enzymu
- pohled uživatelů
  - důležitá stálá a známá aktivita
  - snadná skladovatelnost (lab. teplota, chladnička)
  - proces purifikace druhotný
  - nepřítomnost interferujících složek
  - bezpečná manipulace

### **Producenti enzymů musí zvládat:**

- hledání nových a vylepšených enzymů
- fermentační procesy produkující enzymy
- purifikaci enzymů v průmyslovém měřítku
- přípravu a balení enzymů k prodeji
- spolupráci se zákazníky
- vyjednávání s regulačními orgány

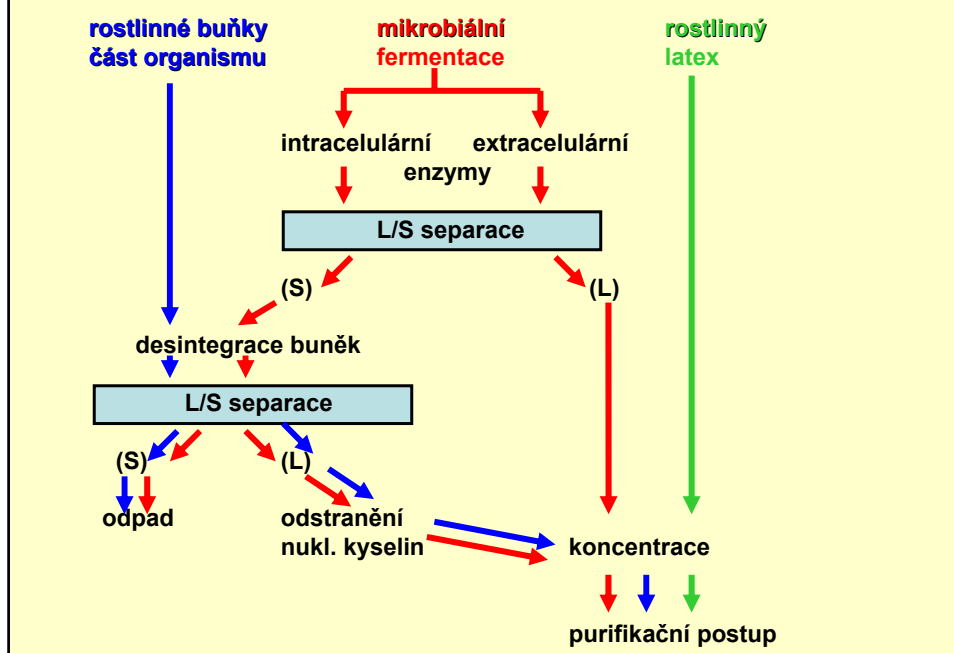
### **Hledání nových enzymů**

- při hledání žádané aktivity se prohledávají mikrobiální kultury, získané obvykle z půdy, kompostu nebo kalů nacházejících se v přítomnosti potenciálního substrátu
- metody bioinformatiky - prohledávání genových knihoven na výskyt sekvencí kodujících podobné enzymy
- lze upravovat vlastnosti stávajících enzymů metodami proteinového inženýrství (cílená mutace vedoucí k vyšší aktivitě nebo žádané specifitě)

## **Materiál pro získání enzymů**

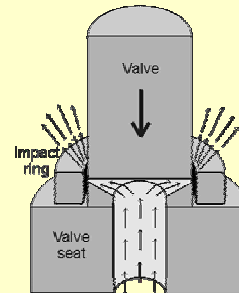
- zjištění velikosti přítomné aktivity v různých složkách materiálu
  - intra / extracelulární u mikrobů a tkáňových kultur, část rostliny nebo živočicha) - z čeho vycházet
  - v které fázi růstu je nejvyšší aktivita
  - kritérium porovnávání - specifická aktivita
- první krok - převedení enzymu do vodného prostředí z pevného materiálu (za chladu, vhodný pufr, desintegrační metody)
- další kroky - frakcionace

## **Výchozí koncentrát**



## Desintegrace buněk

- potřebné úsilí závisí na typu organismu a částečně i na jeho fyziologii
  - někdy stačí pouze osmotický šok (změna iontové síly prostředí) - živočišné buňky, G- bakterie
  - rezistentní - kvasinky, sinice, mycelia, některé G+ bakterie (tolerují až 2 MPa osm. tlaku, "jako beton")
- **ultrazvuk** (ozvučování při 18 kHz - 1 MHz)
  - rychlý sin. pohyb hlavice generátoru v kapalině, malý rozsah (pod 50  $\mu\text{m}$ ), velké zrychlení (až 80000 g), nastává kavitace - mikrobublinky, tlakové vlny v důsledku jejich kolapsu až 300 MPa, buňky narušuje také střížná síla
  - některé enzymy konformačně labilní
  - mohou vadit i vznikající radikálové formy kyslíku
- **vysokotlaké homogenizátory** (Manton-Gaulin)
  - pumpa vytlačuje buněčnou suspenzi ventilem s malým otvorem, tlak přes 150 MPa, průtok až 10  $\text{m}^3/\text{h}$



## Desintegrace buněk

- **kuličkové mlýny** (kuličky 0,2 až 1 mm, ocel nebo sklo - Ballotini)
  - nárazy na kuličky, gradienty střížných sil
  - vhodnější pro větší buňky, méně pro menší bakterie
- **mrazové lisování** (X-press, French press)
  - zmražená buněčná pasta se pod vysokým tlakem (150 až 230 MPa) protlačuje úzkým otvorem
  - desintegraci působí změny objemu a fáze (mikrokrystalky ledu)
  - vhodné pro termolabilní enzymy
  - obtížné použití pro masovou produkci
- **lytické metody**
  - efektivní, nenákladné - osmotický šok, zmrazování / rozmrazování, studený šok, vysušování a lyofilizace, enzymová (lysozym na G+ bakterie) nebo chemická (kyseliny, báze, detergenty, rozpouštědla, chaotropní činidla) lyze
- **tepelné působení**
  - může odstranit nežádoucí proteiny (zdenaturují a vysráží se)

### **Nebezpečí při desintegraci buněk**

- teplo
  - chladit; přidat enzymový substrát či analog, polyoly
- střížné síly
- proteasy
  - zrychlená práce, chlazení, inhibitory, nadbytek inertní bílkoviny
- pH
  - použití pufru, přidat substrát či analog, polyoly
- chemické faktory
  - vadí detergenty a rozpouštědla, rostlinné polyfenoly inhibují (adsorbenty - polyvinylpyrrolidon, redukce - askorbát)
- oxidace
  - přidat redukční činidla - askorbát, dithiothreitol
- pění
- těžké kovy (ionty - železo, měď, nikl)
  - přidat chelatační činidla - EDTA

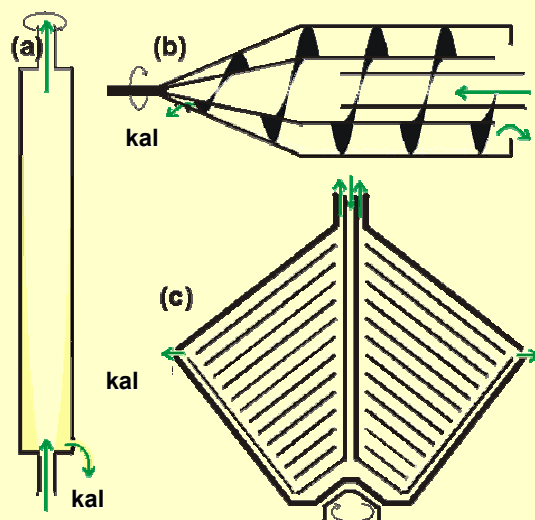
### **Precipitace**

- efektivní precipitace malých fragmentů buněk nesnadná - zvětšení velikosti
  - koagulací (odstranění el. náboje, pH změna)
  - flokulací (přidá se vhodný nosný materiál, na který se agregují opačně nabitě částice) např. na DEAE celulóze, jednorázové použití
- separace - centrifugace nebo filtrace

## Centrifugace

- separace (sediment / supernatant) na základě velikosti částic a rozdílné hustoty
- laboratorní centrifugy - výkyvné nebo úhlové rotory, vysoká úhlová rychlost  $\omega$ , velký poloměr otáčení  $r$ , ale malá kapacita a dlouhá sedimentační vzdálenost
- průmyslové centrifugy
  - kontinuální plnění, kontinuální odebrání supernatantu, různé způsoby odebrání sedimentu
  - preferovány pro získávání sedimentu s enzymem, šetrné - minimální pění (nebezpečí inaktivace)

## Průmyslová centrifugace



výrobci:  
Penwalt (a), Westfalia a  
Alpha-Laval (c)

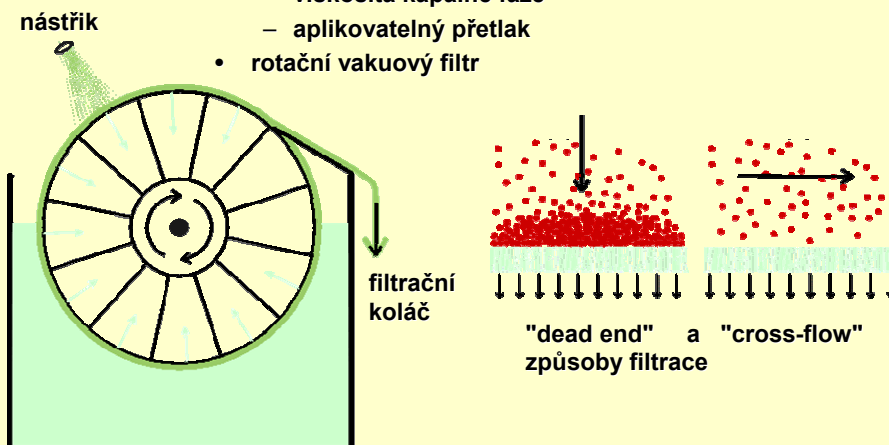
typické rychlosti:  
(a) 50000 g (100 g),  
16000 g (až 5 kg)  
(b) 3000 g (semi/diskont.)  
(c) 8000 g

- (a) tubulární - dlouhá dráha umožní vyčerení  
 (b) kontinuální spirálová - šroub (jiná rychlost) posouvá sediment po povrchu  
 (c) kontinuální multikomorová - paralelní disky poskytnou velkou vyčerovací schopnost při krátké sedimentační dráze



## Filtrace

- separace na základě velikosti částic
- účinnost limitují:
  - tvar a stlačitelnost částic (blokování filtru)
  - viskozita kapalné fáze
  - aplikovatelný přetlak
- rotační vakuový filtr



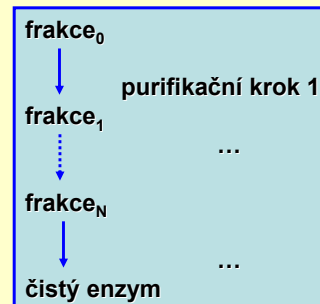
## Proč se enzymy purifikují

- studium dějů v buňce - rekonstrukce metabolických a regulačních drah in vitro
- studium průběhu reakce, kinetiky, regulace, ...
- výzkum odchylek od normálního metabolismu či regulačního procesu - abnormální enzymy (mutace, onemocnění)
- cílený návrh léčiv na základě známé 3D struktury enzymu
- praktické použití jako biokatalyzátory či v medicíně

potřebná míra čistoty samozřejmě závisí na dané aplikaci

## Purifikace enzymů

- mírou čistoty enzymu je specifická aktivita ( $a_s$ ), která narůstá v průběhu purifikačního procesu
- obecně se z výchozího materiálu (frakce 0) purifikačními kroky (srážení, extrakce, chromatografie, aj.) získávají další frakce (N)
- pro kvantitativní hodnocení se pro každou frakci provede její charakterizace - experimentálně se určí **množství** (objem  $V_N$ ), **celková aktivita** ( $a_N$ ) a **hmotnost bílkoviny** ( $m_N$ )
- následně se spočítají pro každou frakci:  
**specifická aktivita**  $a_{s,N} = a_N/m_N$   
**výtěžek**  $= (a_N/a_0) \cdot 100\%$   
**stupeň přečištění**  $= a_{s,N}/a_{s,0}$
- výsledek purifikace se pak přehledně zobrazí ve formě **purifikační tabulky**



## Příklad purifikační tabulky

Purif. krok	Objem	Celk. aktivita	Celk. protein	Spec. aktivita	Výtěžek	Stupeň přečištění
	(ml)	(nkat)	(mg)	(nkat/mg)	(%)	
Hrubý extrakt	500	3000	15000	0.2	100	-
Srážení síranem ammonným	100	2400	4000	0.6	80	3.0
Ionexová chromatografie	45	1440	500	2.9	48	14.5
Gelová filtrace	50	1000	125	8	33	40.0

- celk. aktivita může i "narůst" - odstranění inhibitoru
- kontrola čistoty - SDS PAGE

## **Purifikační kroky**

- precipitační metody
- separace na základě velikosti
- separace na základě náboje
- separace na základě specifické interakce s jinou biomolekulou
- jiné principy

## **Precipitace (srážení)**

- frakcionace solemi
  - obvykle na počátku purifikace - zmenší se objem
  - principem pokles rozpustnosti bílkovin s narůstající iontovou silou,  $\log(\text{rozpustnosti proteinu}) \sim \text{iont. síle}$
- používá se síran amonný
  - dobře tolerován, postupné zvyšování koncentrace - udává se ve stupni nasycení (0 až 1), max. rozpustnost 41.4 až 43.85 hm% (0 až 30 °C), precipitát se odcentrifuguje, pak se pokračuje dále
  - nízká teplota, pH blízko isoelektrickému bodu enzymu (nejmenší rozpustnost)
- organická rozpouštědla
  - vhodné pro velkoobjemové procesy
  - mísitelná s vodou - ethanol, methanol, propanol, aceton, dioxan
  - principem snížení dielektrické konstanty prostředí, odstraní se povrchová voda proteinu
  - velmi pečlivě držet nízkou teplotu, jinak denaturace

## **Tepelná denaturace**

- lze použít, pokud daný enzym je tepelně stabilnější než balastní bílkoviny, které zdenaturují a vysráží se
- stabilizace enzymu - přidání substrátu, koenzymu či kompetitivního inhibitoru
- několikaminutové zahřátí na 50 až 60 °C, pak rychlé ochlazení a odstředění balastů, případně odstranění inhibitoru dialysou
- není univerzálně použitelná
- ekonomicky výhodná metoda

## **Fázová separace**

- některé polymery jsou ve vodném prostředí navzájem "nekompatibilní", což vede k separaci dvou vodných fází
  - využitelné pro separaci bílkovin
    - příklady: dextran/PEG, hydroxypropylovaný škrob/PEG
    - fáze vznikají při překročení kritických koncentrací obou polymerů (např. 2%dextran T500/10% PEG4000, první tvoří hydrofilní dolní hustší fázi, druhý lehčí hydrofobnější horní fázi)
    - polymery mají stabilizační účinek na proteiny
    - rychlá separace, mírné podmínky
    - vhodné pro průmyslové použití, kontinuální aplikaci, separaci od buněčných fragmentů
- po přechodu enzymu do PEG fáze a jejím oddělení se provede další fázová separace s konc. roztokem soli či dalším polymerem
- polymer lze vhodně modifikovat ligandem - afinitní fázové separace

## **Chromatografické postupy**

- používá se vzorek v kapalně fázi
- nejčastější ionexová, afinitní a gelová permeační chromatografie (použití v tomto pořadí)
- nosič nesoucí vhodné funkční skupiny, funguje jako náplň kolony (i membránové varianty, případně kompaktní porézní monolitický materiál)
- hnací silou přetlak (nízkotlaké a HPLC varianty, velikosti částic 50 - 150  $\mu\text{m}$ , resp. 4 - 6  $\mu\text{m}$ )
- z kolony vytékají postupně jednotlivé frakce
- hodnocení dle absorbance při 280 nm (koncentrace bílkoviny), dále se hledá aktivita ve frakcích
- automatizovaný systém, včetně sběrače frakcí

## **Chromatografický systém**

- nástřík vzorku (2-polohový ventil se smyčkou)
- zásobník(-y) mobilní fáze (základní pufr, eluční pufr)
- pumpy (peristaltické, lineární vysokotlaké, může stačit i hydrostatický tlak)
- míchač gradientu
- separační kolona
- detektor (UV/VIS, absorbance, méně často fluorescence)
- sběrač frakcí
- řídicí počítač a software

## Ionexová chromatografie

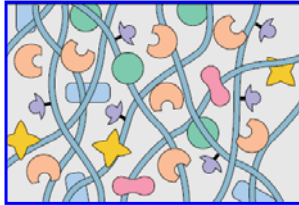
- enzymy v roztoku mají náboj dle svého isoelektrického bodu  $pI$  a  $pH$  prostředí ( $pH < pI$  pozitivní,  $pH > pI$  negativní) a budou se tedy vázat na povrch s opačným nábojem
- reverzibilní proces, ovlivňuje  $pH$  a iontová síla (zvýšení normálně slouží pro eluci), eluce náhlou změnou pufru nebo gradientem
- nosiče na bázi pryskyřic, celulosy a jejích derivátů, zesítěná agarosa (Sephacrose), Trisacryl, HEMA, polystyren
- nesoucí nabitě skupiny  
katex:  $-SO_3^-$ ,  $-OPO_3^-$ ,  $-COO^-$     anex:  $-N^+HR_2$ ,  $-N^+R_3$
- průmyslové použití je často vsádkové místo kolonového  
– opatrně míchat
- úlohu hrají porozita, mechanická odolnost, vazebná kapacita
- střední účinnost, typické přečištění 3x
- dodavatelé: Pharmacia, BioRad, Tesek, ...

## Afinitní chromatografie

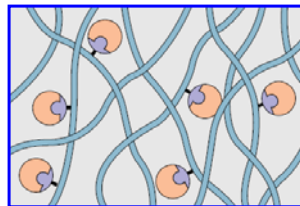
- víceméně specifická interakce enzymu s ligandem (substrát, inhibitor, kofaktor, ...) imobilizovaným na nosiči
- dnes široká škála technik
- i méně specifické varianty:
  - barviva podobná  $NAD^+$  pro purifikaci dehydrogenas
  - HIC, hydrofobní interakce (imobilizované krátké methylenové řetězce, např. C8, nebo fenyl), vnáší se enzym ve vysoké konc. soli (po vysrážení), eluuje se poklesem iontové síly, změnou  $pH$  či gradientem org. rozpouštědla
  - IMAC "immobilized metal affinity chromatography" - imobilizovaný chelát (NTA, nitrilotriacetic acid) naváže ionty  $Ni^{2+}$ , které pak z druhé strany vytváří komplex s His skupinami enzymu (využívá se u rekombinantně připravovaných enzymů nesoucích na konci uměle přidané His zbytky (oligohistidine tag)
  - boronátová afinitní chromatografie - interakce imobilizované kyseliny borité se sacharidovými zbytky - glykosylované enzymy
- vysoká purifikační účinnost (až 1000x přečištění, typicky 10x)

## Princip afinitní chromatografie

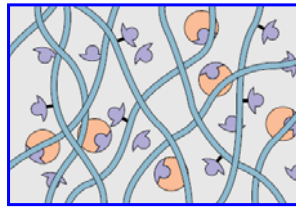
1. nanesení vzorku na matici



2. propláchnutí



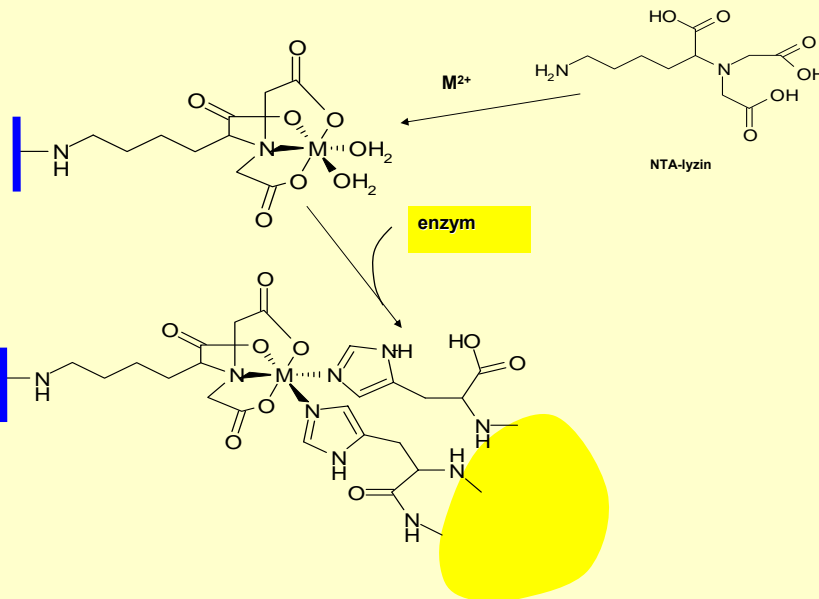
3. přidání volného ligandu



eluce

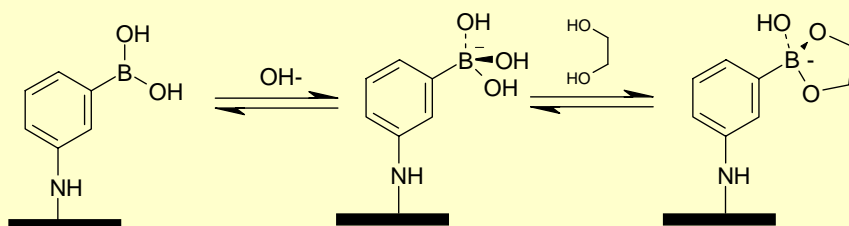


## Metaloafinitní chromatografie



## Boronátová afinitní chromatografie

- matrice s imobilizovanou kyselinou aminofenylboritou, případně aminofenyl-3,5-diboritou
- vzniká komplex se sloučeninami obsahujícími diolové uskupení - typické pro sacharidy
- možnost purifikace glykoproteinů



## Gelová permeační chromatografie

- "size exclusion" chromatography, "gel filtration"
- separace na základě velikosti biomolekul
  - větší molekuly projdou matricí rychleji - nevlezou se do pórů a nejsou tedy zdržovány
- materiály:
  - zesíťované dextranové gely (Sephadex G, Pharmacia)
  - zesíťovaný polyakrylamid (Bio-Gel P, BioRad)
  - zesíťovaná agarosa (Sephacrose CL, Superose, Pharmacia)
  - směs PAG a agarosy (Ultrogel AcA, LKB Instruments)
  - ethylenglykol methakryláty (Fractogel HW, Toyo Soda Co. - TSK)



## **"Nácvik" purifikace enzymů**

- <http://home2.btconnect.com/agbooth/archive/swingPP/ProtLab.html>
- program Proteins.COM (DOS okno ve Windows)

## **Inaktivace enzymů**

- oddisociování koenzymu
- disociace podjednotek u oligomerních enzymů
- agregace (mohou vzniknout intermolekulové S-S můstky)
- nevratné konformační změny
- adsorpce na povrch používaných nádob
- střižné síly vznikající při proudění (ztráta aktivní konformace)
- změny primární struktury
  - hydrolysa peptidové vazby
  - oxidace -SH skupin nebo indolového kruhu Trp, redukce S-S
  - chemická modifikace -SH skupin v aktivním místě
  - deaminace Asn
  - autoinaktivace při katalyze (vznikající volné radikály)

## Uchovávání enzymů

- **zakoncentrování zředěného enzymu**
  - ultrafiltrace - tlaková filtrace přes ultrafiltr vhodné porosity (aby enzym neprotekl) - systémy Amicon, centrifugační mikrofiltry
  - osmotické zahuštění - roztok enzymu v dialyzační trubici se obsype vhodným akvacidem - odnímá vodu (např. PEG)
- **stabilizační postupy**
  - cílem je zachovat aktivní konformaci a zabránit rozvinutí, agregace či změnám v kovalentní struktuře
  - vyšší koncentrace enzymu
  - vysoká koncentrace neutrální soli - stabilizace hydrofobních interakcí (chaotropní efekt - narušení struktury obalové vody) - síran amoný, hydrogenfosforečnan draselný
  - polyoly - glycerol (chrání i před vznikem krystalků ledu za nízkých teplot), sorbitol, manitol - snižují aktivitu vody, vytváří ochranný obal
  - hydrofilní polymery - polyvinylpyrrolidon, PVA, hydroxypropylcelulosa - "compartmentalisation" - náhrada vzájemných interakcí vazbou na polymer
  - kovalentní derivatisace - např. u proteas se blokují lysiny - menší autolýza

## Ochrana enzymů

- chránění -SH skupin - 2-merkapt ethanol, cystein, dithiothreitol (Clelandovo činidlo), dithioerythritol
- chránění před proteinasami - fenylmethylsulfonylfluorid a EDTA
- antimikrobiální prostředky (azid)
- **převedení do suchého stavu - lyofilisace**
  - odstraní se soli dialysou
  - vysušení zmrazeného roztoku ve vakuu (mrazová sublimace)
- **"lepší" enzymy**
  - zdrojem izolace termofilní organismy
  - imobilisace
  - chemická modifikace
  - proteinové inženýrství (cílená záměna aminokyselin)

## **Kontrola čistoty**

- elektroforesa za nativních podmínek - jediná zóna
- SDS PAGE - určí se podjednotkové složení a molekulové hmotnosti
- 2D elektroforesa - kombinace isoelektrické fokusace (určení pI) a SDS PAGE (Mr)
- jeden pík při gelové permeační chromatografii
- malé enzymy - hmotnostní spektrum (MALDI TOF)
- frakcionace proteasou a MS spektrum vzniklých štěpů