

3977/83



-53933-

Közművelődési és Sportbiztosítási
Minisztérium

1989. 08. 04.
C 12 N 9/00
C 12 N 9/10

50.074/BE

KIVONAT

Eljárás új ciklodextrin-glikozil-transzferázok előállítására
UOP, Des Plaines, Illinois, Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1989. 08. 04.

Elsőbbsége: 1988. 08. 05. (228,647)

Amerikai Egyesült Államok

A találmány új ciklodextrin-glikozil-transzferázok előállítására vonatkozik, amelyek ciklodextrinek előállítására alkalmazhatók.

A találmány szerinti három ciklodextrin-glikozil-transzferáz molekulatömegükkel, izoelektromos pontjukkal, maximális enzimatiszus aktivitásukkal, az előállítható ciklodextrinek arányával, valamint a béta-ciklodextrin átalakulásával jellemezhetők.

Az enzimek NRRL B-18373, -18374 és -18375 törzsek tenyésztésével állíthatók elő.

algebra
J. J. J. J.

3977/89

0500

A

Közzététel példány

S.B.G. & K.
Budapesti Nemzetközi Ügyvédi
és Patentszolgálati Iroda
1051 Budapest, Pálffy utca 10.
Telefon: 133-8103, 131-4100

-53933-

50.074/BE

NSO C 12 N 9/00
9/10

Eljárás új ciklodextrin-glikozil-transzferázok előállítására
UOP, Des Plaines, Illinois, Amerikai Egyesült Államok
Feltalálók: ALLENZA Paul, Bartlett,

MORRELL Marie J., Des Plaines, Illinois,
Amerikai Egyesült Államok

A bejelentés napja: 1989. 08. 04.

Elsőbbsége: 1988. 08. 05. (228,647)

Amerikai Egyesült Államok

A találmány tárgya eljárás ciklodextrin-glikozil-transzferáz előállítására.

A ciklodextrinek 1-4 kötésekkel kapcsolódó alfa-D-glükopiranoz egységekből felépülő ciklikus vegyületek. A legfontosabbak közülük a 6, 7 és 8 glükóz-egységet tartalmazó, gyűrű alakú ciklodextrinek (ezeket rendre alfa-, béta- és gamma-ciklodextrinnek nevezik), amelyek sokoldalú felhasználhatóságukkal tűnnek ki a más gyűrűméretű ciklodextrinek közül. Jó felhasználhatóságuk oka az, hogy képesek reverzibilisen inklúziós komplexek (klatrátok) képezésére számos más típusu vegyülettel.

Inkluziós komplexről akkor beszélünk, ha egy molekulának - mint a ciklodextrineknek - olyan belső ürege van, amelybe más molekulák bejuthatnak és ott gyenge kölcsönhatások (pl. van der Waals erők) által megkötődnek. A van der Waals erők rövid távolságon érvényesülő kölcsönhatások, amelyek elég erősek egy határozott szerkezetű, általában szilárd halmazállapotú komplex létrehozásához, de elég gyengék, hogy lehetővé tegyék a komplex gyors disszociációját, az alkotó molekulákra.

A ciklodextrinek fánk alakú molekulák, amelyek belső üregének méretét és alakját a gyűrűt alkotó glükóz-egységek száma szabja meg. Az alfa-ciklodextrin ürege csaknem henger alakú, kb. 0,7 μm mély és 0,5 μm átmérőjű. A béta- és gamma-ciklodextrinek ürege ugyanilyen mély, de átmérőjük 0,7, illetve 0,9 μm . A ciklodextrinek vízben jól oldódnak, mert a gyűrű külső oldalán számos hidroxil-csoport található. Az üreg belseje azonban hidrofób jellegű, így a ciklodextrinek megkötetik a vízben oldott szerves vegyületeket, ha molekuláik mérete megfelelő és kellően hidrofób jellegűek.

A ciklodextrinek komplexképző tulajdonsága számos gyakorlati felhasználásuk alapja. Példaként említhetjük különböző íz- és aroma-anyagok ciklodextrinokkal történő "kapszulázását", ami lehetővé teszi hosszú időn át való tárolásukat és az ételek elkészítésekor való felhasználásukat. Fordított esetben a ciklodextrinek alkalmasak lehetnek a nemkívánatos íz- és szaganyagok ételekből való eltávolítására. Használják a ciklodextrin-

neket ételek tartósítására, így az oxidációtól, a fény okozta bomlástól vagy a hőbomlástól való megvédésére is. A ciklodextrinek gyakorlati alkalmazásait Szejtli J. közleménye foglalja össze (Starch, 34. 379-385 /1982/).

A ciklodextrinek használatának széles körű elterjedését viszonylag magas árak akadályozza, aminek a jelenlegi gyártási eljárások korlátai az oka. A ciklodextrinek aránylag alacsony kitermeléssel (jellemzően 50 % alatt, általában 25-35%) lehet előállítani a keményítő átalakításával. További hozamcsökkentő körülmény, hogy az átalakítást a kiindulási anyag hig oldatában lehet csak elvégezni, amiből a ciklodextrinek nehezen nyerhetők ki.

A ciklodextrinek előállítását mikroorganizmusokból nyert ciklodextrin-glikozil-transzferáz enzimmal végzik. Az ismert enzimtermelő mikroorganizmusok hátrányos tulajdonságai késztettek minket megfelelőbbek keresésére. A használhatóság feltételének az enzim termelésével összefüggő gyakorlati tényezőket, mint pl. a költséget vagy az egyszerű előállíthatóságot tekintettük. Egyebek között ilyen a mikroorganizmus gyors te-nyészthetősége egyszerű táptalajokon. Másik fontos követelmény, hogy az enzim termelése extracellulárisan és széles pH-intervallumban történjen, azaz a termelés csak kevésbé függjön a körülmények változásaitól. Lényeges az is, hogy az enzim ki-nyerése és tisztítása könnyen megoldható legyen.

A ciklodextrin-glikozil-transzferáz enzimmal szemben is számos követelmény támasztható. Kivánatos, hogy az enzim szé-

les pH-tartományban legyen működőképes, de az optimális pH-tartománya legyen inkább szűk. Legyen könnyen tisztítható és lehetőleg ne legyen aktivitás-veszteség a tisztítás során. A felezési ideje 40°C hőmérsékleten több hét legyen, különösen immobilizálás esetén. További követelmény, hogy ne csak oldatban, hanem megfelelő hordozóra rögzítve (immobilizálva) is használható legyen, azaz könnyen lehessen rögzíteni és ne igényeljen koenzimet vagy fémiót aktivitásának kifejtéséhez.

Kutatásaink eredményeként számos, ciklodextrin-glikozil-transzferáz aktivitást mutató baktériumot izoláltunk talajból, amelyeket részletesen megvizsgáltunk. Az izolátumok között három olyant találtunk, amelyek ciklodextrin-glikozil-transzferáza több szempontból egyedülálló tulajdonságokat mutat.

A találmány tárgya olyan új ciklodextrin-glikozil-transzferáz előállításra, amely széles pH-tartományban magas aktivitással rendelkezik, egyszerűs és veszteség nélkül tisztítható, könnyen immobilizálható, aktivitásához nem igényel koenzimet vagy fémiót, és felezési ideje 40°C hőmérsékleten több hét. A találmány szerinti eljárás termékei azok a ciklodextrin-glikozil-transzferáz enzimek, amelyeket az NRRL B-18373, az NRRL B-18374 és az NRRL B-18375 jelzésű baktérium-törzsek termelnek. A fenti jelzések a Northern Regional Research Center of U.S. Department of Agriculture (Peoria, Illinois, Egyesült Államok) mikroorganizmus-gyűjteményében 1988. június 7-én létbe helyezett tenyészetek nyilvántartási számai.

A találmány tárgya tehát új ciklodextrin-glikozil-transzferázok előállítása, amelyek számos fontos tulajdonságukban különböznek az ismert ciklodextrin-glikozil-transzferázoktól. Ezeket az enzimeket három, korábban ismeretlen, talajból izolált baktérium-törzs termeli, bár lehetséges, hogy ugyanilyen vagy hasonló enzimeket más mikroorganizmusok is termelhetnek. Kijelenthetjük, hogy a találmány szerint előállított ciklodextrin-glikozil-transzferázoknak számos olyan, korábban említett előnyös tulajdonságuk van, amely alkalmazásukat előnyössé teszi az ismert ciklodextrin-glikozil-transzferázokkal szemben.

A következőkben a megnevezett mikroorganizmusokkal a ciklodextrin-glikozil-transzferáz előállítását mutatjuk be. Az adott mikroorganizmus-törzset az alábbi összetételű táptalajban tenyésztjük:

4	mmol	magnézium-szulfát
0,03	mmol	mangán-szulfát
6,8	mmol	nátrium-klorid
5,4	mmol	kálium-klorid
14,6	mmol	dikálium-hidrogén-foszfát
1,6	mmol	citrát-só
1	mmol	kalcium-klorid
10	mmol	ammónium-klorid
0,06	mmol	ammónium-szulfát
0,06	mmol	vas(II)-szulfát
1	v%	keményítő
0,01	%	élesztőkivonat

A tenyésztést szokványos, 12 l-es fermentorban végezzük, amit 5% inokulummal (egy éjszakán át 30°C-on inkubálva) oltunk be és 30°C-on, teljes levegőztetéssel működtetünk. A tenyészetből kétóránként veszünk mintát a szaporodás, a kémhatás és a ciklodextrin-glikozil-transzferáz aktivitás meghatározására; ez utóbbit a KI-módszerrel mérjük (kálium-jodid). A ciklodextrin-glikozil-transzferáz aktivitás mérése során a tenyészetet magát tekintettük "enzimnek". A tenyésztés későbbi szakaszában (kb. 24 óra után) a mintákat centrifugálással sejtmentesítettük és a felüluszból végeztük az aktivitás mérését. A tenyésztést akkor fejeztük be, ha az enzim-aktivitás 4 órán át állandó maradt vagy csökkent. Az alább leírt tisztítási eljárást alkalmazva a fermentléből jellemző módon az összes aktivitás mintegy 50 %-át lehet kinyerni, míg a specifikus aktivitás (egyés/mg fehérje) 128.000-ról 580.000-re emelkedett az első lépéstől (a sejtmentes fermentlé 0,2 µ-os szűrésétől) a teljesen megtisztított enzimig.

Az aktivitás mérése a következőképpen történik. A szubsztrát 0,2 %-os keményítő-oldat, amely 5 mmol kalcium-kloridot és 100 mmol imidazolt is tartalmaz (pH) 7,0). 300 µl fenti szubsztráthoz 10 µl enzimet adunk, a reakcióelegyet 10 percen át 40°C-on inkubáljuk. A reakciót 4,0 ml 0,2 N sósavval leállítjuk, majd 0,5 ml reagenst (0,20 % kálium-jodidot és 0,02 % jódot tartalmazó oldatot) adunk hozzá. A kontrol esetében a szubsztráthoz előbb a sósavat, azután az enzimet adagoltuk. Az aktivitás számításához a

$$\text{aktivitás (egység/ml)} = \frac{\text{Ext}_k - \text{Ext}_r}{0,01 \times \text{Ext}_k} \times 100$$

képletet használjuk, ahol Ext_k és Ext_r a kontrol és a reakcióelegy 700 nm-nél mért extinkciója. A mérés 1250 és 5000 egység/ml értékhatárok között ad pontos eredményt.

Mivel mindhárom törzs ciklodextrin-glikozil-transzferáza extracelluláris enzim, a kinyerést megkönnyíti a baktériumok eltávolítása centrifugálással. A további műveleteket 4°C-on végezzük. A sejtmentes felülszóhoz folyamatos keverés közben 200 g/l ammónium-szulfátot adagolunk, majd 50 g/l granulált oldhatatlan keményítőt. Az elegyet további egy órán át keverjük, majd a keményítőt szűréssel kinyerjük és levegőn megszárítjuk. A száraz terméket újra felfuszpendáljuk egy, a kívánt enzim-koncentrációtól függő mennyiségű oldatban, amely 10 mmol dikálium-hidrogén-foszfátot, 3 mol nátrium-kloridot és 0,1 mol maltózt tartalmaz (pH = 7,5). Egy órás, szobahőmérsékleten való keverés után a keményítőt szűréssel eltávolítjuk, amit addig ismételünk, amíg az oldat könnyen át nem folyik a 0,2 µm-es szűrőn. Az így nyert oldatot nagy térfogatú, 5 mmol glicint és 5 mmol kalcium-kloridot tartalmazó (pH = 7,0) oldattal szemben dializáljuk. A termék az a tisztított enzim, amit a legtöbb vizsgálatban használtunk.

A molekulatömeg meghatározása

A molekulatömeg meghatározásához az enzimet a következő módon tisztítjuk meg. A fermentlevet egy éjszakán át 4°C-on ülepedni hagyjuk, majd a zavaros felülszót 2 µm-es membrán-szűrőn megsűrjük. Ezzel a módszerrel elkerülhető, hogy az en-

zímber sejték illetve más enzimek is legyenek. A következő lépésben az oldatot olyan membránszűrőn szűrjük, amely 10.000 dalton molekulatömegig átengedi a fehérjét, így az eredeti térfogat egytizedére koncentrált, csak 10.000 daltonnál nagyobb molekulatömegű fehérjét tartalmazó oldatot nyerünk. A továbbiakban a korábban leirt tisztítási eljárást követjük azzal a módosítással, hogy a keményítőt 100 g/l koncentrált oldat mennyiségben használjuk és a kivonási lépést háromszor ismételjük meg. A kiszűrt keményítőt egyesítjük, az enzim leoldását a lehető legkisebb térfogatú oldattal végezzük el és addig ismételjük, amíg az újabb oldatok aktivitást mutatnak. A magas aktivitású frakciókat egyesítjük, dializáljuk és vagy közvetlenül használjuk a mérésekhez, vagy liofilizálással és újraoldással tovább koncentrálnak.

A molekulatömeg meghatározása U.K. Laemmler módszerével történt (Nature, 222, 680 /1979/). Az új ciklodextrin-glikozil-transzferázok mellett meghatároztuk a *Bacillus circulans* 170, 430 és 860 jelzésű törzsei által termelt és hasonló módon tisztított enzimeinek, valamint a *Bacillus macerans* enzimének (nyers preparátum, Amano-gyártmány) molekulatömegét is. Az összes mintát egy térfogatrészben adjuk 9 térfogatrész pufferhez és 10% nátrium-dodecil-szulfonátot tartalmazó poliakrilamid-gélen elektroforézist végzünk. A futtatás után a gélt Coomassie-kékkel megfestjük, a felesleges festéket 7 % jégecet tartalmazó 30 %-os metilalkohollal kimossuk. Az enzimek molekulatömegét az ismert molekulatömegű referencia-

-fehérjék helyzetéhez viszonyítva határozzuk meg.

Az izoelektromos pont meghatározása

A molekulatömeg meghatározásához készített mintákkal azonos módon tisztított mintákat helyeztünk kereskedelemben kapható (LKB Pharmacia) izoelektromos fókuszáló gélekre (pH 3,5-9,5). A futtatást az anódról 1 mólos foszforsavval, a katódról 1 mólos nátrium-hidroxiddal végeztük, a kezdő feszültség 520, a végső 1520 V volt, az áramerősség 60 mA-tól 6,5 mA-ig változott. A futtatás után a gélek pH-ja 3,8-8,1 volt. A géleket 4 % szulfoszalicilsavat és 12,5 % triklórecetsavat tartalmazó 30 %-os metilalkoholban fixáltuk, majd 0,04 % Coomassie-kéket, 0,5 % rézszulfátot és 10 % ecetsavat tartalmazó 27 %-os etilalkoholban festettük meg.

A pH-optimum mérése

Az optimális pH-tartomány meghatározásához az enzimek aktivitását a szokványos reakcióelegyben mértük (2 % maltrin 150, 5 mmol kalcium-klorid) és a különböző pH-kat citromsav, glicin és imidazol pufferekkel állítottuk be. A reakciókhoz 1 ml szubsztrátot használtunk és 3 órán át inkubáltuk 40°C-on. Ezután a mintákat zárt fecskendőkből (a práoltság okozta veszteség elkerülésére) 2 percre felforraltuk és lehűtöttük. A visszamaradt keményítőt feleslegben adott alfa-amiláz enzimmel elbontottuk (30-60 perc inkubálás 60°C-on). A mintákat ezután fagyasztva tároltuk a nagynyomású folyadék-kromatográfiás vizsgálatig, amivel az alfa-, béta- és gamma-ciklodextrin mennyiségét határoztuk meg.

A béta-ciklodextrin termelés mérése 2 % maltrin 150 szub-
sztrátot és 5 mmol kalcium-kloridot tartalmazó, 5 mmol imid-
azollal pH = 7,0-re beállított és 10 % etilalkoholt is tartal-
mazó reakcióelegyben, 40°C-on történt.

Az új ciklodextrin-glikozil-transzferázok számos előnyös
tulajdonságát az 1. táblázat foglalja össze. Ismert, hogy a
ciklodextrin-glikozil-transzferázoknak legalább két alaptipusa
létezik: az egyik főleg alfa-, a másik főleg béta-ciklodextrint
termel, legalábbis a reakció kezdeti szakaszában (H. Bender,
Advances in Biotechnological Processes 6., 37.o., Alan R. Liss
Inc., 1986). A táblázatból látható, hogy a *Bacillus macerans*
és az NRRL B-18375 törzs enzimeit az első alaptípushoz, míg a
Bacillus circulans, az NRRL B-18373 és B-18374 törzsek enzimeit
a második alaptípushoz tartoznak. A kétféle enzim molekula-
tömege 65.000 és 73.000 dalton. Az első típusba tartozók izo-
elektromos pontja 8,5 körül van, míg a másodikba tartozóké mind
az előbbiektől, mind egymástól különbözik.

1. Táblázat

A ciklodextrin-glikozil-transzferázok jellemzői

Az enzimek eredete

	<u>Bacillus macerans</u>	<u>NRRL B-18375</u>	<u>NRRL B-18373</u>	<u>NRRL B-18374</u>	<u>Bacillus circulans</u>
Molekulatömeg (kDalton)	65+3	65+3	73+3	73+3	65+3
Izoelektromos pont (pI)	8,6	8,5	6,8	7,8	8,5
Ciklodextrinek aránya ^d (alfa:béta:gamma)	1:1,5:1	1:1,5:1	2,5:9:1	3:12:1	1,3:21:1
Optimális pH ^a (40°C)	~6	6,5+ .2	7,8+ .2	7,2+ .2	6,5
pH határok, 90 ^b	nem vizsgáltuk	5,5-7,6	6,4-9	5,75-7,7	5,4-8,2
75 ^b	nem vizsgáltuk	4,6-8,3	5,25-9	4,8 -8,2	4,9-8,75
Maximális béta-ciklodextrin ^c termelés	19	17	22,5	23	24

a. a maximális aktivitás pH-ja

b. pH-tartomány, ahol az aktivitás a maximum 90, ill. 75%-a (40°C)

c. szubsztrát: 2% maltrin 150, 10 % etilalkohol, 40°C, pH=7.

d. arány a maximális béta-ciklodextrin termelés körülményei között, 40°C

999

Szabadalmi igénypont

Eljárás ciklodextrin-glikozil-transzferáz előállítására, amely

- (1) 73 kilodalton molekulatömegű, izoelektromos pontja 6,8, maximális enzimatis aktivitását 40^oC-on körülbelül 7,8 pH-n fejti ki, míg körülbelül 90%-os aktivitásu 6,4-9,0 pH tartományban, 75%-os aktivitásu 5,25-9,0 pH tartományban, alfa, béta és gamma ciklodextrin körülbelül 2,5:9:1 arányu elegyét képezi, szokásos körülmények között a béta-ciklodextrin konverziója 22,5%;
- (2) 73 kilodalton molekulatömegű, izoelektromos pontja 7,8, maximális enzimatis aktivitását 40^oC-on körülbelül 7,2 pH-n fejti ki, míg körülbelül 90 %-os aktivitásu 5,7-7,7 pH tartományban, 75%-os aktivitásu 4,8-8,2 pH tartományban, alfa, béta és gamma ciklodextrin körülbelül 3:12:1 arányu elegyét képezi, szokásos körülmények között a béta-ciklodextrin konverziója 23%;
- (3) 65 kilodalton molekulatömegű, izoelektromos pontja 8,5, maximális enzimatis aktivitását 40^oC-on körülbelül 6,5 pH-n fejti ki, míg körülbelül 90%-os aktivitásu 5,5-7,6 pH tartományban,, 75%-os aktivitásu 4,6-8,3 pH tartományban, alfa, béta és gamma ciklodextrin körülbelül 1:1,5: 0,1 arányu elegyét képezi, szokásos körülmények között a béta-ciklodextrin konverziója 17%, azzal jellemezve, hogy az NRRL B-18373, NRRL B-18374, illetve

NRRL B-18375 törzset tápközegben tenyésztjük és a kapott ciklodextrin-glikozil-transzferázt elkülönítjük.

ábra készült
13 oldal
Levegő

A meghatalmazott

[Handwritten signature]
S.B.C. & K.
Budapesti Nemzetközi Ügyvédi
és Patentszolgálati Iroda
63. Budapesti Fővárosi út 10.
Telefon: 100-3100, 101-4400

[Handwritten signature]