



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

259581

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 9/24

(22) Prihlášené 27 12 86

(21) (PV 9951-86.W)

(40) Zverejnené 15 03 88

(45) Vydané 15 03 89

(75)

Autor vynálezu

VRŠANSKÁ MÁRIA RNDr. CSc., BIELY PETER RNDr. CSc., BRATISLAVA

(54) **Spôsob purifikácie extracelulárnej endo-1,4- β -xylanázy kvasiniek *Cryptococcus albidus***

1

2

Riešenie sa týka jednostupňovej purifikácie extracelulárnej endo-1,4- β -xylanázy kvasiniek *Cryptococcus albidus* indukovanej syntetickým induktorom metyl β -D-xylopyranozidom. Podstatou riešenia je to, že enzým sa z indukčného média kvasiniek získa ako homogénna bielkovina v jednom purifikačnom stupni ionexovou chromatografiou na kolóne karboxymetyl derivátu sieťovaného bakteriálneho dextranu (CM-Sephadex C-50) ekvilibrovaného v acetátovom pufrí o pH 4,5 až 5,5 tak, že indukčné médium zbavené kvasiniek sa preleje cez prípravnú kolónu nosiča, na ktorom sa enzým zachytí a z ktorého sa potom enzým uvoľní elúciou stúpajúcim gradientom chloridu sodného po 1,0 až 1,5 M koncentráciu. Enzým má použitie vo sfére základného a aplikovaného výskumu orientovaného na využitie lignocelulózových odpadov a na uvoľňovanie celulózoých vlákien z rastlín ako sú lan a konope, účinkom enzýmových preparátov. Dá sa využiť i na prípravu vzácnych 1,4- β -xylooligosacharidov z aryl β -D-xylopyranozidov.

Vynález sa týka jednostupňovej purifikácie extracelulárnej endo-1,4- β -xylanázy kvasiniek *Cryptococcus albidus* indukovanej syntetickým induktorom metyl β -D-xylopyranozidom (P. Biely, Z. Krátký a M. Vršanská, CS AO 206 914).

Endo-1,4- β -xylanázy (EC 3.2.1.8) mikroorganizmov sú spravidla enzýmy sekretované bunkami do prostredia počas rastu na rastlinných xylanoch, celulóze a iných rastlinných materiáloch obsahujúcich hemiceľulózu. Izolujú a purifikujú sa z rastových médií zbavených buniek producenta. V prvom kroku purifikácie sa rastové médium zahusťuje ultrafiltráciou, vákuovou destiláciou, lyofilizáciou alebo sušením. Zo zahustených preparátov sa bielkoviny zrážajú buď organickými rozpúšťadlami, alebo s íranom amónnym. Koncentrované extracelulárne bielkoviny alebo získané bielkovinné frakcie sa frakcionujú gélovou filtráciou na sieťovaných polyméroch, alebo ionexovou chromatografiou na rôznych druhoch anionov a katexov ako sú napríklad dietylaminoetyl a karboxymetyl deriváty celulózy a dextránov, a využíva sa tiež hydroxyapatit a mnohé iné nosiče. Prehľad použitých metód purifikácie xylanáz možno nájsť v článku R. F. H. Dekkera a G. N. Richarda [Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. **32**, 277, 1976]. Purifikácia xylanáz z rastových médií, v ktorých sa používa xylan alebo iný rastlinný materiál ako zdroj uhlíka, býva komplikovaná skutočnosťou, že zdroj uhlíka sa mikroorganizmom nespotrebuje úplne a jeho zvyšky v rastovom médiu interferujú s purifikáciou enzýmu v dôsledku enzým-substrátových interakcií. Príklad interferencie zvyšného xylanu možno nájsť i v prípade purifikácie kvasničnej xylanázy (P. Biely, M. Vršanská, Z. Krátký, Eur. J. Biochem. **108**, 313, 1980), ktorej je venovaný tento vynález. Uvedeným ťažkostiam sa dá vyhnúť tak, že produkcia enzýmu v bunkách sa navodí nízkomolekulárnymi látkami, ktoré nie sú súčasne jeho substrátom. U niektorých mikroorganizmov ako sú *Streptomyces* (K. Nakanishi, T. Yasui a T. Kobayashi, J. Ferment. Technol. **54**, 801, 1976), kvasinky *Cryptococcus albidus* (P. Biely, Z. Krátký a M. Vršanská, CS AO 206 914) a *Cryptococcus flavus* (T. Yasui, B. T. Nguyen a K. Nakanishi, J. Ferment. Technol. **62**, 353, 1984) sa dá produkcia xylanázy indukovať metyl β -D-xylopyranozidom. V prípade *Streptomyces* boli takto indukované xylanázy purifikované klasickými chromatografickými metódami v kombinácii s preparatívnou izoelektrickou fokusáciou (M. Marui, K. Nakanishi a T. Yasui, Agr. Biol. Chem. **49**, 3 399, 1985). Výhoda indukcie xylanázy nízkomolekulárnym induktorom sa pri jej purifikácii prvýkrát využila v prípade enzýmu kvasiniek *Cryptococcus flavus*. Purifikácia enzýmu sa dosiahla v jednom stupni chromatografiou vákuove za-

husteného média na kolóne SP-Sephadexu C-25 (K. Nakanishi, H. Arai a T. Yasui, J. Ferment. Technol. **62**, 361, 1984). K uvoľneniu enzýmu z uvedeného katexu dochádza pri relatívne nízkej koncentrácii chloridu sodného (0,05 M), čo kladie pomerne vysoké nároky na odstránenie solí z indukčných médií, ktoré by bránili naviazaniu enzýmu na nosič. Extracelulárna xylanáza kvasiniek *Cryptococcus albidus*, patriaca medzi najlepšie preštudované enzýmy tohto druhu (P. Biely, Z. Krátký a M. Vršanská, Eur. J. Biochem. **119**, 559, 1981), sa z indukčných médií s metyl β -D-xylopyranozidom v minulosti nepurifikovala. Spôsob purifikácie takto indukovaného enzýmu je predmetom tohto vynálezu.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že extracelulárna endo-1,4- β -xylanáza kvasiniek *Cryptococcus albidus* indukovaná metyl- β -D-xylopyranozidom tak ako sa popisuje v CS AO 206 914 sa z indukčného média kvasiniek získa ako homogénna bielkovina v jednom purifikačnom stupni ionexovou chromatografiou na kolóne karboxymetyl derivátu sieťovaného bakteriálneho dextranu (CM-Sephadex C-50, Pharmacia Uppsala, Švédsko) ekvilibrovanom v acetátovom pufrí, pH 4,5 až 5,5 tak, že indukčné médium zbavené kvasiniek centrifugáciou sa priamo, alebo po zahutnení vákuovou destiláciou alebo ultrafiltráciou preleje cez pripravenú kolónu nosiča, na ktorom sa enzým zachytí a z ktorého sa potom enzým uvoľní elúciou lineárnym gradientom chloridu sodného po 1,0 až 1,5 M koncentráciu. V prípade použitia 0,05 M acetátového pufru o pH 5,0 sa enzým vytesní z kolóny ako ostrá bielkovinná frakcia pri 0,45 M koncentrácii chloridu sodného, ktorá sa buď priamo, alebo po zahutnení destiláciou alebo ultrafiltráciou, prípadne odsolení dialýzou alebo ultrafiltráciou použije ako zdroj purifikovanej xylanázy.

Výhodou tohto spôsobu purifikácie extracelulárnej endo-1,4- β -xylanázy *Cryptococcus albidus* je to, že

— je jednoduchý a rýchly predovšetkým v porovnaní s postupom purifikácie enzýmu z rastových médií obsahujúcich rastlinné xylany ako zdroj uhlíka,

— enzým sa vytesňuje z ionexového nosiča vysokou koncentráciou soli (0,45 M chlorid sodný), čo umožňuje enzým viazať na ionexe priamo prelievaním indukčných médií zbavených buniek cez ním náplnené kolóny; koncentrácia solí v indukčných médiách je nižšia než koncentrácia potrebná na vytesnenie adsorbovaného enzýmu,

— enzým sa získa ako elektroforeticky homogénny preparát, ktorý poskytuje počas izoelektrickej fokusácie v rozmedzí pH 3 až 7, tri až štyri bielkovinné zóny vykazujúce súčasne enzýmovú aktivitu úmerne k zastúpeniu jednotlivých bielkovín.

Príklad 1

Kvasinky *Cryptococcus albidus* CCY 17-4-1 (CCY, Československá zbierka kvasiniek, Chemický ústav CChV SAV, Bratislava) vyrastené na tekutej syntetickej pôde obsahujúcej 0,67 % kvasničnej dusíkatej bázy, 0,2 % L-asparagínu, 0,5 % dihydrogenfosforečnanu draselného, 1,0 % D-xylózy na rotačnej trepačke pri 27 °C počas 24–48 hodín sa odstredia a prenesú do rovnakého syntetického média ako je uvedené vyššie iba s tým rozdielom, že D-xylóza sa nahradí metyl β -D-xylopyranozidom v koncentrácii 0,5 mg/ml. Po 24 až 48 hodinovej inkubácii na rotačnej trepačke pri 27 °C sa suspenzia kvasiniek centrifuguje a supernatant obsahujúci v 1 ml približne 1,4 jednotiek xylanázy sa zahustí na rotačnej vákuovej odparke pri 35 °C na 1/5 až 1/10 pôvodného objemu, zdialyzuje sa oproti destilovanej vode pri 4 °C (20 hodín) a pre-

leje sa cez kolónu CM-Sephadexu C-50 (1,8 × 20 cm) ekvilibrovaného 0,05 M acetátovým pufróm o pH 5,0. Po pretečení objemu vzorky sa kolóna eluuje lineárnym gradientom chloridu sórneho v 0,05 M acetátovom pufrí (240 ml) až po 1,5 M koncentráciu chloridu sórneho. Zachytávajú sa 3,5 ml frakcie, ktoré sa analyzujú na enzymovú aktivitu a bielkoviny. Na obr. 1 je znázornená elúcia xylanázy z kolóny CM-Sephadexu C-50. V zachytávaných frakciách sa stanovili bielkoviny meraním absorbančie pri 280 nm (bodkovaná čiara), aktivita xylanázy (plná čiara cez body) a koncentrácia chloridu sórneho (prerušovaná čiara). Aktívne frakcie sa zlejú, dialyzujú proti destilovanej vode (4 °C, 20 hodín) a použijú ako enzymový preparát. Enzým sa získa v 35 %-nom výťažku o špecifickej aktivite 42,6 jednotiek na mg bielkoviny (tabuľka 1).

Tabuľka 1

Purifikácia xylanázy kvasiniek *Cryptococcus albidus* indukovanej metyl β -D-xylopyranozidom

Štádium purifikácie	Objem ml	Celková aktivita jedm. ^a	Celkové bielkoviny mg	Špecifická aktivita jedm./mg	Výťažok %
Indukčné médium	480	816	120	6,8	100
Koncentrované indukčné médium	80	760	104	7,3	93
CM-Sephadex	33	290	6,8	42,6	35,5

^aStanovenie enzymovej aktivity a definícia jednotky enzymovej aktivity je popísané v literatúre (P. Biely, M. Vršanská a Z. Krátký, Eur. J. Biochem. **108**, 313, 1980).

Enzým indukovaný metyl β -D-xylopyranozidom je totožný s enzýmom produkovaným kvasinkou *Cryptococcus albidus* počas rastu na xylane a purifikovaným podľa publikovaného postupu (P. Biely, M. Vršanská a Z. Krátký, Eur. J. Biochem. **108**, 313, 1980). Oba preparáty dávajú jedinú a rovnako sa pohybujúcu difúznou zónu bielkoviny a enzymovej aktivity počas elektroforézy v polyakrylamidovom géli. Enzýmy sa javia identické počas izoelektrickej fokusácie v tenkej vrstve polyakrylamidového gélu v rozmedzí pH 3 až 7. Niekoľko foriem bielkovín detekovaných farbivom Comassie Brilliant Blue R-250 vykazovalo úmerne k množstvu bielkoviny enzymovú aktivitu, ktorá sa detekovala kovalentne vyfarbeným xylanom (P. Biely, O. Markovič a D. Mislovičová, Anal. Biochem. **144**, 147, 1985).

Príklad 2

Supernatant s naindukovanou xylanázou získaný centrifugáciou suspenzie kvasiniek inkubovaných s metyl β -D-xylopyranozidom

tak ako je popísané v príklade 1 sa nezaťhuje, ale priamo prelieva cez kolónu CM-Sephadexu C-50. Zachytená xylanáza sa z kolóny vytesní a ďalej spracuje tak, ako je uvedené v príklade 1. Výťažok a stupeň purifikácie enzýmu odpovedá hodnotám v tabuľke 1.

Príklad 3

Enzým sa u kvasiniek indukuje tak, ako je popísané v príklade 1 a aplikuje sa na kolónu CM-Sephadexu C-50 tak, ako je uvedené v príklade 2. Xylanáza sa z kolóny vytesní nasledovne: kolóna sa najprv premyje 0,25 M roztokom chloridu sórneho v 0,05 M acetátovom pufrí o pH 5,0 (75 ml) a potom lineárnym gradientom chloridu sórneho po 1,0 M koncentráciu v rovnakom acetátovom pufrí (150 ml). Xylanáza sa izoluje zahustením a odsolením frakcie vytesnenej pri 0,45 M koncentrácii chloridu sórneho. Výťažok a stupeň purifikácie enzýmu odpovedá hodnotám v tabuľke 1.

Endo-1,4- β -xylanázy sú v poslednom období predmetom intenzívneho štúdia v súvisi s narastajúcim záujmom o využitie lignocelulóзовých odpadov ako zdrojov sacharidov pre fermentačný priemysel. Purifikovaná xylanáza kvasiniek *Cryptococcus albidus* sa dá v tomto zmysle využiť ako modelový enzým. Ďalšie použitie má vo sfére základného výskumu, hlavne pri štrukturálnych štúdiách xylanov a pri štúdiu úlohy xylanáz v procese izolácie celulóзовých

vlákien z rastlín ako sú konope a ľan, účinkom komplexných enzýmových preparátov, ktorých súčasťou sú aj xylanázy. Purifikovaná xylanáza kvasiniek *Cryptococcus albidus* sa dá využiť na prípravu pomerne vzácných 1,4- β -xylooligosacharidov z aryl β -D-xylopyranozidov transglykozylačnými reakciami, ktoré enzým katalyzuje pri vysokých koncentráciách aryl xylozidov [Z. Krátký, P. Biely a M. Vršťanská, CS AO 218 624].

PREDMET VYNÁLEZU

1. Spôsob purifikácie extracelulárnej endo-1,4- β -xylanázy kvasiniek *Cryptococcus albidus* indukovanej metyl β -D-xylopyranozidom vyznačujúci sa tým, že indukčné médium s obsiahnutým enzýmom sa uvedie do styku s ionexom na báze karboxymetyl derivátu sieťovaného bakteriálneho dextranu, na ktorý sa enzým naadsorbuje a z ktorého sa potom uvoľní stúpajúcim gradientom chloridu sódného až do 1,5 M koncentrácie.

2. Spôsob podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že sa nosič na chromatografiu ekvilibruje acetátovým puferom o pH 4,5 až 5,5.

3. Spôsob purifikácie podľa bodov 1 a 2 vyznačujúci sa tým, že sa použije 0,05 M acetátový pufer o pH 5,0 a enzým sa uvoľní pri 0,45 M koncentracii chloridu sódného.

4. Spôsob podľa bodov 1 až 3 vyznačujúci sa tým, že enzýmový roztok sa ďalej zbaví solí a zahustí.

1 list výkresov

