



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

223 475

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 25 09 81
(21) PV 7082-81

(51) Int. Cl. C 12 N 9/00

(40) Zveřejněno 28 01 83
(45) Vydáno 01 05 84

(75)

Autor vynálezu MAREK MIROSLAV ing.CSc., DĚČÍN
VALENTOVÁ OLGA RNDr.CSc., PRAHA
DEMNEROVÁ KATEŘINA ing., PRAHA
VODRÁŽKA ZDENĚK doc.dr.ing.DrSc., PRAHA

(54) Způsob zvýšení aktivity buněčných enzymů

Vynález se týká způsobu zvýšení aktivity buněčných enzymů, který spočívá v tom, že se buněčné stěny částečně rozruší. Částečná destrukce buněčných stěn se provede oxidačním štěpením sacharidové složky buněčné stěny, s výhodou působením kyseliny jodisté jodistanovými ionty v množství 0,025 až 0,5 mmolů na 1 g vlhkých buněk při pH 4 až 8 po dobu 1 až 24 hod. Takto aktivované buňky se používají k přípravě imobilizovaných preparátů u nichž se dosahuje takto vyšší aktivity enzymů, než u původních nativních buněk.

223 475

Vynález se týká způsobu zvyšování aktivity buněčných enzymů.

Enzymových systémů buněk je v největší míře dosud využíváno v technologických potravinářského průmyslu. V poslední době však dochází k prudkému rozvoji biotransformací i v organické chemii, kde se začínají čím dál více uplatňovat i mikrobiální transformace. Význam a možnost využití enzymových systémů buněk výrazně vzrostl ve spojení s jejich imobilisací. Použitím imobilisovaných buněk je odstraněna velmi obtížná izolace produktu z reakční směsi, přičemž aplikovaný biokatalysátor může být opakovaně použit. Využití enzymových systémů buněk k biochemickým transformacím může být dále zvýhodněno podle vynálezu zvýšením aktivity na biotransformaci se podílejících enzymů.

Způsob zvýšení aktivity buněčných enzymů podle vynálezu, spočívá v tom, že se na polysacharidy obsažené v buněčné stěně působí jodistanovými ionty v množství 0,025 až 0,5 mmolů na 1 g vlhkých buněk při pH 4 až 8 a teplotě 0 až 30 °C po dobu 1 až 24 hod. Doba, po kterou dochází k jodistanovému štěpení polysacharidů, je nepřímě úměrná koncentraci jodistanových iontů.

Výhoda uvedeného způsobu zvýšení aktivity buněčných enzymů spočívá v šetrnosti a experimentální jednoduchosti použité metody, při níž si upravené buňky ponechávají ve srovnání s protoplasty potřebnou stabilitu vůči změnám osmotického tlaku i mechanickým vlivům. Protoplastů se používá ke studiu jejich vlastností a možnosti křížení kmenů. Příprava protoplastů s ohledem na zvýšení enzymové aktivity nebyla popsána vzhledem k mechanické nestabilitě protoplastů a náročnosti jejich přípravy.

K částečné destrukci či úplnému odstranění buněčných stěn /za vzniku sferoplastů nebo protoplastů/ je převážně používáno lytických enzymů. Pro tvorbu bakteriálních protoplastů se běžně používá lysozymu, tj. enzymu specificky katalysujícího hydrolysu β -1 $\rightarrow$ 4 glykosidové vazby mukopeptidových jednotek bakteriálních buněčných stěn. Pro přípravu kvasinkových protoplastů se nejčastěji používá komplexu enzymů ze žaludečních šťáv hlemýžďe *Helix pomatia*. Vedle těchto dvou nejběžnější používaných enzymových preparátů existuje řada dalších lytických enzymů, převážně mikrobiálního původu. K destrukci buněčných stěn byla použita též chemická činidla, tvorbu buněčných stěn negativně ovlivňuje přítomnost některých antibiotik. Vzniklé protoplasty zůstávají zachovány pouze v prostředí o vhodném osmotickém tlaku, jinak cytoplasmatická membrána praská a dochází k úplné lysi buněk.

Výhoda způsobu zvýšení aktivity buněčných enzymů podle vynálezu spočívá v šetrné parciální destrukci buněčných stěn oxidativním štěpením polysacharidů obsažených v buněčných stěnách kyselinou jodistou, respektive jodistanovými ionty. Na 1 g vlhkých buněk se používá 0,025 až 0,5 mmolů jodistanu sodného při teplotě 0 až 20 °C.

Částečně rozrušené buňky si ponechávají potřebnou stabilitu vůči změnám osmotického tlaku i mechanickým vlivům za současného zvýšení enzymatické aktivity.

Vynález je dokumentován příklady použití.

Příklad 1

Buňky *Saccharomyces cerevisiae* kultivované v kompletním mediu se sacharosou a glukosou byly po odstředění promyty 0,05 M fosfátovým pufrům pH 6,5. K odstředěným buňkám o invertasové aktivitě 29 nkat/g vlhkých buněk /stanoveno Somogyiho metodou/ byl přidán 0,05 M acetátový pufr pH 6,5 v poměru 12,5 ml na 1 g vlhkých odstředěných buněk /v/w/ a 0,05 M jodistan sodný /1:1, v/w/. Směs byla třepána 6 h při 4 °C za nepřístupu světla.

U oxidovaných buněk *Saccharomyces cerevisiae* byla po odstředění a promytí 0,05 M fosfátovým pufrém pH 6,5 stanovena invertasová aktivita 113 nkat/g vlhkých buněk.

Příklad 2

Buňky *Streptomyces nigrificans* kultivované v mediu s xylosou a glukosou byly po odstředění promyty 0,05 M fosfátovým pufrém pH 6,9. K odstředěným buňkám o isomerasové aktivitě 149 nkat/g vlhkých buněk /stanoveno cystein-karbazolovou metodou dle Dische a Borenfreunda/ byl přidán 0,05 M fosfátový pufr pH 6,9 v poměru 12,5 ml na 1 g vlhkých odstředěných buněk /v/w/ a 0,05 M jodistan sodný /2:1, v/w/. Směs byla třepána 6 h za nepřístupu světla.

U oxidovaných buněk *Streptomyces nigrificans* byla po odstředění a promytí 0,05 M fosfátovým pufrém pH 8,5 stanovena glukosa isomerasová aktivita 241 nkat/g vlhkých buněk.

Příklad 3

K oxidovaným buňkám *Saccharomyces cerevisiae* připravených podle příkladu 1 byla po promytí 0,05 M fosfátovým pufrém pH 6,5 a odstředění přidána 10%ní želatina v tomtéž pufru v poměru 20 ml roztoku želatiny na 1 g vlhkých buněk /v/w/. Za intenzivního míchání byl ke směsi přidán 5%ní vodný roztok glutaraldehydu /5:1, v/w/. Po zapolymerování byly imobilisované buňky důkladně promyty 0,05 M fosfátovým pufrém pH 5,0. Somoogyiho metodou byla stanovena jejich invertasová aktivita 34 nkat/g vlhkého preparátu.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob zvýšení aktivity buněčných enzymů, vyznačující se tím, že se na polysacharidy obsažené v buněčné stěně působí jodistanovými ionty v množství 0,025 až 0,5 mmolů na 1 g vlhkých buněk při pH 4 až 8 a teplotě 0 až 30 °C po dobu 1 až 24 hod.