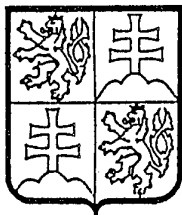


ČESKÁ A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD  
PRO VYNÁLEZY

# PATENTOVÝ SPIS 276 074

(21) Číslo přihlášky : 3988-90. H  
(22) Přihlášeno : 14 08 90  
(30) Prioritní data :  
  
(40) Zveřejněno : 18 03 92  
(47) Uděleno : 22 01 92  
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku : 18 03 92

(13) Druh dokumentu : B6  
(51) Int. Cl.<sup>5</sup> :  
C 12 N 9/02

(73) Majitel patentu : ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A BIOCHEMIE ČSAV,  
PRAHA

(72) Původce vynálezu : MACEK TOMÁŠ ing. CSc.,  
KRÁLOVÁ BLANKA ing. CSc.,  
STRNADOVÁ PAVLA ing.,  
VANĚK TOMÁŠ RNDr.,  
DEMNEROVÁ KATEŘINA ing. CSc., PRAHA

(54) Název vynálezu : Způsob přípravy enzymu askorbát oxidasy  
z rostlinných buněk kultivovaných in vitro

(57) Anotace :

Askorbát oxidasa se izoluje z rostlinných buněk rostlinných druhů např. z čeledi lilkovitých, routovitých, tykvovitých nebo pýchovitých kultivovaných in vitro v podobě selektovaných kmenů nediferencovaných buněk, buněčných agregátů, diferencovaných orgánů, celých rostlin, embryí či nádorových rostlinných buněk, odvozených po transformaci Agrobacterie ve formě kalusové nebo sumersní kultury. Namnožená kultura se extrahuje fosfátovým puřem pH 4,2 až 9,8 v množství 0,3 až 5-násobné hmotnosti čerstvé biomasy, odstředí se, supernatant se vysráží např. síranem amonným při nasycení mezi 20 až 70 % hmot. a čistí se chromatografií na iontoměníči a gelovou filtrací.

Vynález se týká nového způsobu získávání enzymu askorbát oxidasy (L-askorbát:O<sub>2</sub> oxidoreduktasa, E. C. 1.10.3.3., dále jen AO) z rostlinných buněk kultivovaných in vitro.

Dosavadní způsob získávání AO z oplodí okurek a tykví (viz E. Beránková, B. Králová, Sborník VŠCHT E60, str. 95-113, 1986) je nevýhodný vzhledem k sezónnosti a nárazové dostupnosti suroviny, která navíc obsahuje mnoho balastních látek, rušících při izolaci a purifikaci enzymu. Oplodí lze získávat pouze v určitém omezeném období zralosti plodů, která se nekryje s obdobím konzumní zralosti. Výtěžek závisí značně na klimatických podmínkách a celou sklizeň ohrožuje napadení fytopatogenními organismy. Tyto faktory způsobují výkyvy v ceně suroviny, případně i její dočasnou úplnou nedostupnost.

Zmíněné nevýhody odstraňuje způsob přípravy AO z rostlinných buněk vybraných rostlinných druhů např. z čeledi lilkovitých, routovitých, tykvovitých nebo pýchavkovitých kultivovaných in vitro v podobě selektovaných kmenů nediferencovaných buněk, buněčných agregátů, diferencovaných orgánů, celých rostlin, embryí či nádorových rostlinných buněk odvozených po transformaci Agrobacteriem, přičemž selektované produkční kmene se pěstují ve formě povrchové kultury na zpevněném médiu nebo v submerzní kultuře, případně také s využitím imobilizačních technik. Enzym se získá extrakcí biomasy fosfátovým pufrům pH 4,2 až 9,8 v množství 0,3 až 5-násobné hmotnosti čerstvé biomasy, odstředí se, supernatant se vysráží např. síranem amonným při nasycení mezi 20 až 70 % hmot. a čistí se chromatografií na iontoměničích a gelovou filtrací.

Způsob podle vynálezu umožňuje celoroční kontinuální produkci nezávisle na klimatických změnách či napadení porostů patogenními mikroorganismy. Další výhodou je zjednodušení isolačního postupu, neboť není třeba odstraňovat tolik balastních látek jako u polních plodin (chlorofyl apod).

Jako produkční organismy askorbát oxidasy podle vynálezu jsou vhodné například vybrané kultury buněk routy, ostropestřece mariánského, tabáku, novozélandské rostliny poroporo a dalších.

Při praktickém provedení vynálezu se produkční organismus AO kultivuje na ztužené živné půdě nebo v tekutém médiu, vhodném pro produkci enzymu. Jako zdroj živin lze u širokého spektra rostlinných druhů použít kultivační média s potřebným obsahem minerálních látek (např. médium podle Murashige a Skooga), s přísadkou vhodných přirozených či syntetických růstových regulátorů typu auxinů a cytokininů v optimální kombinaci typu a vzájemného poměru jejich množství. Jako zdroj uhlíku lze použít sacharózu, glukózu, laktózu a podobně.

Teplota kultivace se pohybuje v rozmezí mezi 17 až 33 °C, a doba kultivace se liší podle podmínek pro dosažení maximálního výtěžku AO v rozpětí 5 dnů až 3 měsíce.

Z takto vypěstované kultury se AO získává po extrakci čerstvé, zmrazené nebo lyofilizované biomasy za chladu tlumivým roztokem, nejlépe fosfátovým, a to po mechanické či enzymové homogenizaci, za použití jeho 0,3 až pětinasobku hmotnosti čerstvé biomasy. S výhodou lze použít tlumivého roztoku o pH v rozpětí 4,2 až 8,9 o koncentraci 0,05 až 0,3 molu litr. Hrubý extrakt obdrženy po odstředění takto získaného materiálu se dále čistí tak, že se supernatant vysráží např. síranem amonným při nasycení mezi 20 až 70 % hmot. a čistí se chromatografií na iontoměničích a gelovou filtrací. Výtěžek enzymu lze zvýšit přidáním některých látek, jako je ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), Trion X-100 apod.

Aktivita AO v extraktech se zjišťuje pomocí kyslíkové elektrody postupem popsány autory Speck A. J., Schrijver J., Schreus W. H. P., Agr. Food Chem., 32, 352, 1984, v modifikaci podle Beránková E., Králová B., Sborník VŠCHT, E60, str. 95-113, 1986.

Využití askorbát oxidasy je možné zejména v klinické biochemii a v potravinářském průmyslu ke stanovení obsahu vitamínu C. Dále má AO četné aplikace při použití v kombinaci s jinými enzymy a kolorimetrickými činidly, jako testovací nebo diagnostické činidlo.

Následně jsou uvedeny konkrétní příklady praktického provedení vynálezu, které však tento vynález nikterak neomezují.

## Příklad 1

Získání AO z kalusové kultury poroporo (*Solanum aviculare* Forst.)

Biomasa rostlinných buněk obsahující AO byla získána tak, že buňky kmene GL-5 byly kultivovány na kompletním agarovém živném médiu podle Murashige a Skooga, s přidavkem 2,4-dichlorofenoxyoctové kyseliny jako auxinu a kinetinu jako cytokininu, v koncentraci  $1 \times 10^{-7}$  mol/litr, ve tmě při teplotě 28 °C. Homogenní kalusová kultura byla po dosažení stacionární fáze růstu oddělena od živné půdy. Čerstvá biomasa byla za chladu homogenizována s fosfátovým tlumivým roztokem a extrahována podle výše zmíněného postupu. Získaný hrubý extrakt obsahoval v jednotlivých vzorcích 450 až 800 nkat aktivity AO na 1 g sušiny.

## Příklad 2

Získání AO z nediferencované kalusové kultury tabáku (*Nicotiana tabacum* L.)

Nediferencovaná homogenní kalusová kultura tabáku byla kultivována podle příkladu 1, avšak bez přidavku růstových regulátorů. Habituované kmeny byly získány za použití vhodných selekčních tlaků z kalusové kultury odvozené z asepticky pěstovaných rostlinek. Kmen TSS poskytuje na konci exponenciální fáze růstu v hrubém extraktu získaném popsáním postupem aktivitu AO 300 nkat/1 g sušiny buněk.

## Příklad 3

Získání AO ze submerzně pěstované kultury ostropestřece (*Silybum marianum* L.)

Submerzní kultura suspense jemných agregátů buněk ostropestřece mariánského kmene OP12 byla pěstována v tekutém médiu podle Murashige a Skooga s přidavkem růstových regulátorů  $\alpha$ -naftylooctové kyseliny a benzylaminopurinu o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l. Při kultivaci na kultivačním míchadle s 5 ot/min poskytuje výtěžek aktivity až 1000 nkat/1 g sušiny.

## Příklad 4

Produkce AO transformovanými nádorovými buňkami poroporo (*Solanum aviculare* Forst.)

Nádorové kultury buněk rostliny poroporo byly získány transformací TI plasmidem po infekci asepticky pěstovaných rostlinek suspenzí *Agrobacterium tumefaciens*. Vyselektovaný kmen A5-VR1 je pěstován na médiu podle příkladu 2, aniž by vyžadoval pro svůj růst přidávek exogenních růstových regulátorů. Takto získaná biomasa poskytuje extrakt s aktivitou 250 nkat z jednoho gramu sušiny.

## Příklad 5

Získání AO z diferencovaných rostlinek melounu, asepticky pěstovaných in vitro

Asepticky pěstované diferencované rostlinky melounu (*Cucurbita melo* L.) získané z povrchově sterilizovaných semen na agarovém médiu s přidavkem růstových regulátorů  $\alpha$ -naftylooctové kyseliny a benzylaminopurinu o koncentraci  $10^{-5}$  mol/l. Největší koncentrace AO je obsažena ve stoncích, ale i v extraktech z listů a kořínků je koncentrace AO srovnatelná s jejím obsahem v oplodí a dosahuje hodnot 100 nkat na 1 g hmotnosti čerstvé tkáně.

## Příklad 6

Získání AO z diferencovaných rostlinek melounu, asepticky submerzně pěstovaných in vitro v tekutém médiu

Asepticky pěstované diferencované rostlinky melounu (*Cucurbita melo* L.) získané z povrchově sterilizovaných semen na agarovém médiu s přidavkem růstových regulátorů podle příkladu 5 ( $\alpha$ -naftylooctové kyseliny a benzylaminopurinu o koncentracích  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$  mol/l) byly převedeny do tekutého média o stejném složení bez přidavku agaru a pěstovány na kultivačních míchadlech či třepačkách (100 ot/min) při teplotě 25 °C. Největší koncentrace AO je obsažena opět jako v příkladu 5 ve stoncích. Průměrná koncentrace AO v získané biomase je srovnatelná s jejím obsahem v oplodí a dosahuje hodnot 100 nkat na 1 g hmotnosti čerstvé tkáně.

## Příklad 7

Získání AO z diferencující kultury poroporo (*Solanum aviculare* Forst.)

Biomasa rostlinných buněk obsahující AO byla získána tak, že buňky kmene AVI7C byly kultivovány na kompletním agarovém živném médiu podle Murashige a Skooga, bez přidavku auxinu a cytokininu, na světle při teplotě 30 °C. Diferencující kultura (výhonky) byla po dosažení stacionární fáze růstu oddělena od živné půdy. Čerstvá biomasa byla za chladu homogenizována s fosfátovým tlumivým roztokem a extrahována podle výše zmíněného postupu. Získaný hrubý extrakt obsahoval v jednotlivých vzorcích 250 až 1300 nkat aktivity AO na 1 g sušiny.

## Příklad 8

Získání AO z kalusové kultury ostropestřece mariánského (*Silybum marianum* L.)

Kultura homogenního rozpadavého kalusu kmene OP38S odvozená z asepticky poraněného embrya ostropestřece mariánského byla pěstována na agarovém médiu podle Murashige a Skooga s přidavkem růstových regulátorů  $\alpha$ -naftylooctové kyseliny a benzylaminopurinu o koncentraci  $10^{-6}$  mol/l. Při kultivaci na kultivačním míchadle s 5 ot/min poskytuje výtěžek aktivity až 1000 nkat/1 g sušiny.

## Příklad 9

Získání AO ze suspenzní kultury poroporo (*Solanum aviculare* Forst.)

Biomasa rostlinných buněk obsahující AO byla získána tak, že buňky kmene KK1N, selektované pro optimální růst ve formě jemné suspenze buněk byly kultivovány submerzně v kompletním živném médiu podle Murashige a Skooga, s přidavkem  $\alpha$ -naftylooctové kyseliny jako auxinu a kinetinu jako cytokininu v koncentracích  $4 \times 10^{-3}$  a  $1 \times 10^{-7}$  mol/litr, při teplotě 26 °C. Homogenní suspenzní kultura byla před koncem lineární fáze růstu sklizena filtrací nebo odstředěním živné půdy. Médium obsahovalo 4 až 9 nkat AO v 1 ml. Buněčná biomasa byla za chladu homogenizována s fosfátovým tlumivým roztokem a extrahována podle výše zmíněného postupu. Získaný hrubý extrakt obsahoval v jednotlivých vzorcích 550 až 850 nkat aktivity AO na 1 g sušiny.

## Příklad 10

Získání AO z kultury embryí *Solanum aviculare* Forst. pěstovaných v tekutém médiu

Biomasa rostlinných buněk obsahující AO byla získána tak, že buňky embryogenního kmene AVE03N, rostoucí při submerzní kultivaci v kompletním živném médiu podle Murashige a Skooga, s přidavkem  $\alpha$ -naftylooctové kyseliny jako auxinu a benzylaminopurinu jako cytokininu, v koncentracích  $4 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-7}$  mol/litr, na světle při teplotě 27 °C, ve formě jemné suspenze buněk, byly převedeny do média bez obsahu růstových regulátorů, v němž dochází ke tvorbě diferencovaných embryí. Kultura byla před koncem lineární fáze růstu sklizená filtrací nebo odstředěním živné půdy. Médium obsahovalo 8 až 12 nkat v 1 ml. Buněčná biomasa byla za chladu homogenizována s fosfátovým tlumivým roztokem a extrahována podle výše zmíněného postupu. Získaný hrubý extrakt obsahoval v jednotlivých vzorcích 800 až 1100 nkat aktivity AO na 1 g sušiny.

## Příklad 11

Získání AO z imobilizovaných buněk kultury routy (*Ruta graveolens* L.) při vsádkové kultivaci v tekutém médiu

Buňky suspenzní kultury routy kmene R0205 pěstovaného na médiu podle Murashige a Skooga, s přidavkem  $\alpha$ -naftylooctové kyseliny jako auxinu a kinetinu jako cytokininu, o koncentraci  $4 \times 10^{-6}$  mol/litr, ve tmě při teplotě 27 °C, ve formě jemné suspenze buněk, byly po imobilizaci do gelu alginátu vápenatého převedeny do stejného média bez obsahu růstových regulátorů a opakovaně inkubovány na třepače v pětidenních intervalech. Po dobu pěti cyklů vylučovaly vázané buňky do média průměrnou aktivitu 4 nkat aktivity AO na 1 ml živného roztoku.

## P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob přípravy enzymu askorbát oxidasy z rostlinné biomasy, vyznačující se tím, že jako zdroj enzymu se používají buňky vybraných rostlinných druhů, např. z čeledi lilkovitých, routovitých, tykvovitých, pýchavkovitých, kultivované in vitro v podobě selektovaných kmenů nediferencovaných buněk, buněčných agregátů, diferencovaných orgánů, celých rostlin, embryí či nádorových rostlinných buněk odvozených po transformaci Agrobacteriem, přičemž selektované produkční kmeny se pěstují ve formě povrchové kultury na zpevněném médiu nebo v submerzní kultuře, případně také s využitím imobilizačních technik.

2. Způsob přípravy podle bodu 1, vyznačující se tím, že se rostlinná biomasa získaná kultivací in vitro extrahuje fosfátovým pufrem pH 4,2 až 9,8 v množství 0,3 až 5-násobné hmotnosti čerstvé biomasy, odstředí se, supernatant se vysráží např. síranem amonným při nasycení mezi 20 až 70 % hmot. a čistí se chromatografií na iontoměničích a gelovou filtrací.