



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

218624
(11) (B1)

(22) Prihlášené 20 06 80
(21) (PV 4379-80)

(40) Zverejnené 31 12 81
(45) Vydané 01 06 85

(51) Int. Cl.³
C 07 H 3/06
C 08 B 37/00

(75)

Autor vynálezu

KRÁTKÝ ZDENĚK ing. CSc., BRATISLAVA, BIELY PETER RNDr. CSc.,
BUDMERICE, VRŠANSKÁ MÁRIA RNDr. CSc., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy β -1,4-xylooligosacharidov a β -1,4-(U-¹⁴C)xylooligosacharidov

Vynález sa týka spôsobu prípravy β -1,4-xylooligosacharidov neznačených alebo značených rádio-nuklidom uhlíka ¹⁴C.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že sa na aryl- β -xylozidy alebo aryl- β -(U-¹⁴C)xylozidy v koncentrácii vyššej ako 100 mM pôsobí extracelulárnou β -xylanázou kvasiniek *Cryptococcus albidus* a výsledný produkt sa izoluje papierovou chromatografiou.

Lineárne β -1,4-xylooligosacharidy majú využitie ako modelové látky na štúdium chemických vlastností a reaktivity hemicelulóz. Predstavujú tiež vhodné substráty na štúdium mechanizmu účinku mikrobiálnych β -1,4-xylanáz.

Vynález sa týka spôsobu prípravy β -1,4-xylooligosacharidov neznáčených alebo značených rádionuklidom uhlíka ^{14}C reakciou aryl- β -D-xylopyranozidov s extracelulárnou endo-1,4- β -xylanázou produkovanou kvasinkami *Cryptococcus albidus*.

β -1,4-Mylooligosacharidy sa nachádzajú v značnom množstve v predhydrolyzátoch dreva. Tieto sa však obvykle nepoužívajú na ich izoláciu, lebo obsahujú celý rad ďalších sacharidových zložiek, ktoré komplikujú izolačný proces. Najbežnejšími postupmi prípravy xylooligosacharidov je parciálna kyslá hydrolýza a enzýmová hydrolýza rastlinných a drevných xylánov (R. L. Whistler a C. C. Tu, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1389 [1951], **74**, 3609 [1952], **75**, [1953]; C. T. Bishop, *Can. J. Chem.*, **33**, 1073 [1955]; T. E. Timell, *Svensk Papperstid.*, **65**, 435 [1962]). Predovšetkým enzýmová hydrolýza poskytuje pomerne dobré výťažky vzhľadom na množstvo východzieho xylánu (J. Kusakabe, T. Yasui a T. Kobayashi, *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **49**, 383 [1975]).

Žiadna z uvedených metód však neposkytuje možnosť prípravy β -1,4-xylooligosacharidov značených rádionuklidom uhlíka ^{14}C , pokiaľ sa nezíska ^{14}C značený polysacharid, čo je finančne i experimentálne náročný proces.

Pri štúdiu vlastností extracelulárnej β -xylanázy kvasiniek *Cryptococcus albidus* (P. Biely, M. Vršanská a Z. Krátky, *Eur. J. Biochem.*, v tlači) sa zistilo, že enzým napriek tomu, že vykazuje všetky typické vlastnosti endoxylanázy (hydrolyzuje xylán na xylooligosacharidy, znižuje viskozitu jeho roztokov a nehydrolyzuje xylobiózu) má schopnosť uvoľňovať p-nitrofenol z p-nitrofenyl- β -D-xylopyranozidu podobne ako β -xylozidáza. Podrobným štúdiom tejto reakcie sa zistilo, že rozklad p-nitrofenyl-, o-nitrofenyl- a fenyl- β -D-xylopyranozidu neprebíha hydrolytickým štiepením na xylózu a aglykón, ale je sprevádzaný vznikom xylobiózy, xylotriózy, xylotetraózy a xylózy. Kvantitatívnou analýzou reakčných produktov fenyl- β -D-[U- ^{14}C]xylopyranozidu syntetizovaného z (U- ^{14}C)xylózy podľa Montgomery a spol. (*J. Am. Chem. Soc.* **64**, 690 [1942]) sa dokázala závislosť reakčnej rýchlosti a zloženia produktov reakcie β -xylanázy na koncentrácii substrátu. Najvyššie výťažky oligosacharidov sa dosahujú pri koncentráciách fenyl- β -xylozidu vyšších ako 100 mM. Keďže s výnimkou xylobiózy sa koncentrácie vyšších xylooligosacharidov menia v priebehu inkubácie, t. j. najprv sa akumulujú a neskôr miznú v reakčnej zmesi, reakciu je potrebné zastaviť podľa toho, aký oligosacharid sa izoluje. Za účelom prípravy xylotriózy a xylotetraózy je vhodné reakciu zastaviť približne v štádiu 40 až 50 % rozkladu fenyl- β -xylozidu. Najvyššie výťažky xylobiózy sa dosiahnu, ak sa reakcia nechá pokračovať do ustavenia rovnovážnej zmesi, ktorá už oligosacharidy vyššie ako xylobiózu neobsahuje.

Transglykozylačné reakcie β -xylanázy s aryl- β -xylozidmi sú stereošpecifické, vedú výlučne k tvor-

be xylooligosacharidov s β -1,4-glykozidickými väzbami. Potvrdilo sa to hmotnosťou spektrometriou per-0-metylovanej xylobiózy a hodnotami optickej otáčavosti a bodom topenia kryštalickej xylobiózy izolovanej z enzýmovej reakčnej zmesi. Konštanty boli v zhode s literárnymi údajmi.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že sa na aryl- β -xylozidy alebo aryl- β -(U- ^{14}C)xylozidy v koncentrácii vyššej ako 100 mM pôsobí extracelulárnou β -xylanázou kvasiniek *Cryptococcus albidus* a výsledný produkt sa izoluje papierovou chromatografiou.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy nižších β -1,4-xylooligosacharidov je, že predstavuje v súčasnej dobe jedinú reálnu cestu k získaniu β -1,4-xylooligosacharidov univerzálne značených rádionuklidom uhlíka ^{14}C pri použití aryl- β -D-(U- ^{14}C)xylozidov ako substrátu.

príprava aryl- β -D-xylopyranozidov je z časového hľadiska menej náročná ako izolácia rastlinných xylánov pre enzýmovú hydrolýzu,

nie je viazaná na použitie purifikovanej β -xylanázy, ako zdroj β -xylanázy sa dá použiť zahustené a dialyzované rastové médium kvasiniek *C. albidus* získané po kultivácii kvasiniek na xyláne alebo po indukciu enzýmu metyl- β -D-xylozidom,

pri použití neznáčených aryl- β -D-xylopyranozidov uvedený spôsob prípravy xylobiózy môže konkurovať spôsobu získania týchto látok enzýmovou hydrolýzou xylánu.

Príklad 1

p-Nitrofenyl- β -D-xylopyranozid sa rozpustí vo vode aby sa získal 100 mM roztok. K roztoku substrátu sa pridá preparát extracelulárnej β -xylanázy kvasiniek *Cryptococcus albidus* a zmes sa inkubuje pri 30 °C po dobu 0,5 až 20 hodín. Po inkubácii a zahutnení sa zmes chromatografuje na papieri Whatman No 1 alebo 3 MM v sústave etylacetát-kyselina octová – voda (18 : 7 : 8, v/v). Po detekcii vodiacich pásov sa zóny odpovedajúce xylobióze a xylotrióze vystrihnú, eluujú vodou a po rechromatografii sa oligosacharidy kryštalizujú z vodného metylalkoholu. Výťažky závisia od štádia ukončenia reakcie.

Príklad 2

Kmeň *Cryptococcus albidus* CCY-17-4-1 sa pestuje na pôde obsahujúcej 1 % xylánu, 0,67 % kvasničnej dusíkatej bázy, 0,2 % asparagínu a 0,5 % dihydrofosforečnanu draselného. Po 4 dňoch sa narastené bunky odstránia centrifugáciou a získaná kultivačná tekutina sa zahutí vo vákuu pri 40 °C na 1/10 pôvodného objemu a dialyzuje sa oproti destilovanej vode pri 4 °C. Po dialýze sa objem dialyzačného čreva použije ako preparát β -xylanázy. Roztok fenyl- β -D-xylozidu (150 mM) sa inkubuje s prídavkom enzýmového preparátu (1/10 objemu roztoku substrátu) pri 30 °C. Po ukončení reakcie sa reakčná zmes spracuje ako v bode 1.

Príklad 3

Fenyl- β -D-(U- 14 C)xylózid syntetizovaný z U- 14 C)xylózy sa koncentrácií 150 mM inkubuje s purifikovanou endo-xylanázou pri 30 °C (koncentrácia enzýmu 3 jednotky/ml). Pod jednotkou enzýmu sa rozumie také množstvo enzýmu, ktoré uvoľní za 1 minútu pri 30 °C a pH 5,4 (acetátový pufor) v 0,5 ml inkubačnej zmesi obsahujúcej 1 mg xylánu redukujúcej oligosacharidy rovné 1 mólu xylózových ekvivalentov. Reakčná zmes sa po 0,5 až 20 hodinách zahusťí a chromatografuje na papieri Whatman No 1 v sústave etylacetát-kyselina octová-voda (18 : 7 : 8, v/v). Rádioaktívne produkty sa lokalizujú autorádiografiou, vystrihnú

z papiera a eluujú vodou. V závislosti od štádia zastavenia reakcie sa získajú ($U-^{14}C$)xylobiôza, ($U-^{14}C$)xylotriôza a ($U-^{14}C$)xylotetraôza o špecifickej rádioaktivite rovnjej dvoj-, troj-, štvornásobku špecifickej rádioaktivity východiskového fenyl- ($U-^{14}C$)xylozidu.

Lineárne -1,4-xylooligosacharidy sa využívajú ako modelové látky na štúdium chemických vlastností a reaktivity hemicelulóz. Predstavujú tiež vhodné substráty na štúdium mechanizmu účinku mikrobiálnych -1,4-xylanáz. Z posledného hľadiska majú hlavne význam xylooligosacharidy značené rádionuklidom uhlíka ^{14}C , ktoré nie sú dostupné.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy β -1,4-xylooligosacharidov a β -1,4-(U- ^{14}C)xylooligosacharidov vyznačujúci sa tým, že sa na aryl- β -xylozidy alebo aryl- β -(U- ^{14}C)xylozidy v koncentrácii vyššej ako 100 mM

pôsobí extracelulárnou β -xylanázou kvasiniek *Cryptococcus albidus* a výsledný produkt sa izoluje papierovou chromatografiou.