



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

239 033

(11) (B1)

(61)

(23) Výstavní priorita
(22) Přihlášeno 14 09 83
(21) PV 6693 - 83

(51) Int. Cl.³
C 12 N 9/10

(40) Zveřejněno 15 05 85
(45) Vydáno 01 11 87

(75)
Autor vynálezu

RUML TOMÁŠ ing.,
ŠILHÁNKOVÁ LUDMILA doc.ing.CSc.,
RAUCH PAVEL ing.CSc., PRAHA

(54)

Způsob fermentační výroby thiaminasy I -
thiamin: báze 2-methyl-4-aminopyrimidin-
-5-methenyltransferasy, EC 2.5.1.2

Vynález se týká aerobní kultivace mikroorganismem *Bacillus Thiominolyticus* Kuno, která se provádí ve fermentačním médiu obsahujícím jako stimulátor produkce thiaminasy I, kvasničný autolysát v množství 0,2 až 30 g/l. Produkce thiaminasy I. lze dále zvýšit přidavkem vápníkových iontů v množství 0,01 až 5,0 g/l. Získanou thiaminasu I i v surovém stavu lze použít ke stanovení thiaminu.

Vynález se týká fermentační přípravy enzymu thiaminasy I-thiamin:báze 2-methyl-4-aminopyrimidin-5-methenyltransfery, EC 2.5.1.2., kterýžto enzym může být s výhodou použit pro stanovení vitamínu B₁ v biologickém nebo klinickém materiálu, v potravinářských nebo farmaceutických výrobcích nebo pro vědecké účely.

Vitamin B₁, tj. thiamin a jeho některé deriváty, hraje velmi důležitou roli ve výživě člověka a jeho nedostatek vede k vážným nervovým poruchám (například nemoc beri-beri způsobená silným nedostatkem vitamínu B₁ nebo Wernickeho encefalopatie způsobená nedostatkem thiaminu u alkoholiků). Potravinářské technologie, používané v současné době, vedou k suboptimální koncentraci vitamínu B₁ v lidské výživě ve většině zemí, a proto je v řadě států dávka tohoto vitamínu doplňována syntetickým thiaminem, přidávaným do mouky, pečiva, mléka a podobně. Z těchto důvodů je stanovení celkového thiaminu v jednotlivých potravinářských surovinách a výrobcích i v klinickém materiálu velmi důležité a věnuje se mu stále větší pozornost. Zjišťované koncentrace tohoto vitamínu se pohybují většinou ve zlomcích mg/g analyzovaného materiálu, a proto je pro stanovení thiaminu všeobecně používána fluorometrická thiochromová metoda, dosahující této citlivosti. Tato metoda však vyžaduje pracnou a zdlouhavou izolaci thiaminu, jež je zatížena značnou chybou. Také příprava a aktivace Dekalsa, tj. nejpoužívanějšího sorbentu pro tuto izolaci, je poměrně pracná a časově náročná. Mikrobiologické metody stanovení tohoto vitamínu jsou zatíženy ještě větší chybou a v některých materiálech selhávají úplně.

Pracnost thiochromové metody může snížit použití enzymu thiaminasy I (thiamin:báze 2-methyl-4-aminopyrimidin-5-methyltransferasy, EC 2.5.1.2.), který specificky štěpí thiamin a váže jeho pyrimidinovou složku na bázi (například pyridin) přidanou do reakčního prostředí. Tím umožňuje zjistit nethiochromovou fluorescenci v analyzovaných vzorcích, takže při thiochromové analytické metodě není zapotřebí pracná a zdlouhavá izolace thiaminu z těchto vzorků. C.A.Kennedyová a B.V.McCleary (Analyst 106, 344, 1981) doporučují k tomuto účelu thiaminasu I izolovanou z listů kapradorostů vyskytujících se v Austrálii (například *Marsilea drummondii*, *Marsilea augustifolia*, *Marsilea mutica*, *Pteridium asculentum*, *Cheilanthes sieberi*). Pro tyto účely je nutno tento enzym získat z rostlinného extraktu adsorpcí na DEAE-celulosu a eluát zahustit vakuovou destilací a přečistit opakovanou ultrafiltrací a adsorpcí.

Dalším zdrojem thiaminasy I. může být bakterie *Bacillus thiaminolyticus* Kuno, která ji produkuje do fermentačního prostředí. H.A. Douthit a R.L. Airth (Arch. Biochem. Biophys. 113, 331, 1966) navrhuje pro produkci a izolaci thiaminasy I pro vědecké účely inokulum *Bacillus thiaminolyticus* z bohaté živné půdy (infuze z mozku a srdce) a fermentační medium obsahující vedle běžných zdrojů uhlíku, dusíku a minerálů ještě značné množství glutamové kyseliny a thiamin hydrochlorid v čistém stavu. Bakteriální thiaminasu pro analytické účely izolují vysrážením enzymu z kultivační kapaliny za použití tuhého síranu amonného s následujícím přečištěním. Získaný enzymový preparát uchovávají při -20 °C.

Nedostatky spočívající v nákladné izolaci thiaminasy z rostlinného materiálu a v nákladné živné půdě používané pro produkci bakteriální thiaminasy jsou odstraněny ve způsobu výroby thiaminasy podle vynálezu. Podstata vynálezu spočívá v tom, že se produkční kmen *Bacillus thiaminolyticus* Kuno, s výhodou kmen CCM 3599 Československé sbírky mikroorganismů v Brně, pomnoží v půdě obsahující jako stimulatory produkce

thiaminasy suchý kvasničný autolyzát v množství 0,2 až 30 g/l jako zdroj thiaminu a dodatkových živin a případně ionty vápníku v množství 0,1 až 5 g/l, vedoucí k dalšímu zvýšení výtěžku thiaminasy I. Kultivace probíhala za aerobních podmínek 12 až 48 h a tato kultura se použije jako inokulum pro aerobní produkční kultivaci v tekuté půdě obdobného složení při 30 až 38 °C po dobu 12 až 72 h. Pak se bakteriální buňky oddělí od fermentační kapaliny, nejlépe odstředěním a čirá kapalina, jež se může použít jako surový preparát thiaminasy I. pro stanovení thiaminu a jeho derivátů, se rozplní do vhodných nádobek a uchovává při -15 až -20 °C. Enzymová aktivita zůstává za těchto podmínek zachována déle než 6 měsíců. Pro konzervaci tohoto preparátu, aby mohl být uchováván i při teplotách nad 0 °C /až do 30 °C/, lze použít běžné konzervační prostředky například benzoan sodný do konečné koncentrace 0,2 až 0,3 % kyseliny benzoové v enzymovém preparátu, u něhož se pak upraví pH pomocí kyseliny chlorovodíkové nebo sírové na 4,0 až 5,0. Stabilita takto konzervovaného preparátu je při teplotě 20 až 30 °C více než 4 týdny. Pro prodloužení stability je možno surový enzymový preparát vysušit lyofilizací.

Pro speciální účely je možno surový enzymový preparát přechistit tím, že se enzym z čiré kapaliny izoluje a přechistí některým z běžných izolačních postupů, například frakcionačním vysrážením síranem amonným v kombinaci s gelovou filtrací, iontovou chromatografií a dialysou.

Výtěžnost thiaminasy I. za použití kvasničného autolyzátu a CaCl_2 se oproti půdě popisované H.A. Douthitem a R.L. Airthem /Arch. Biochem. Biophys. 113, 331, 1966/ zvýší zhruba na trojnásobek, jak je zřejmé ze srovnávacích kvasných pokusů provedených metodikou uvedenou v příkladu 1 za použití různých půd /Tab. 1/.

Tabulka 1.

Aktivita thiaminasy I v prokvašeném odstředěném médiu

použitá půda	Aktivita thiaminasy ^{+/} mg rozloženého thi- aminu/1 ml enzym. preparátu/10 minut	% aktivity
Syntetická dle H.A.		
Douthita, R.L.Airtna	1,4	100 %
Syntetická s přidavkem suchého kvasničného autolyzátu /5g/1/	3,1	226 %
Syntetická s přidavkem suchého autolyzátu /5g/1/ a CaCl ₂ .6H ₂ O /2g/1/	4,0	293 %

+/

stanoveno dle E.E.Edwina /Methods in Enzymology/
/D.B.McCormick, L.D.Wright eds./ 62, 113, 1979/ za použití ra-
dioaktivního ¹⁴C/ thiaminu /4,48 µg o celkové aktivitě 332 nCi
na 1 µl odstředěného prokvašeného media. Reakce probíhala 10 mi-
nut při 40 °C a pH 6,4.

Příklad 1

Jednolitrová baňka se 150 ml sterilní živné půdy obsahují-
cí v jednom litru 18,0 g glycerolu, 3,0 g močoviny, 5,0 g citrá-
tu sodného .2H₂O, 5,0 g suchého kvasničného autolyzátu, 1,0 g
KH₂PO₄, 2,0 g Na₂HPO₄.12H₂O, 2,0 g CaCl₂.6H₂O, 1,1 g NaCl, 0,7 g
MgSO₄.7H₂O, 0,03 g FeSO₄.7H₂O a mající pH upraveno na 7,2 se za-
očkuje 1,0 ml 24 hodinové třepané kultury Bacillus thiaminolyti-
cus Kuno CCM 3599 vyrostlé při 33 ± 2 °C na půdě stejného slože-
ní. Inkubuje se za třepání 66 h při 33 ± 2 °C. Pak se kultura
ochladí, bakteriální buňky se oddělí odstředěním, k čirému su-
pernatantu se přidá tuhý benzoan sodný do konečné koncentrace
0,2 % kyseliny benzoové /váha/objem/ a pH supernatantu se upra-
ví pomocí HCl o koncentraci 1 mol/l na 4,5 až 5,0. Takto získa-
ný surový enzymový preparát se rozpíná do vhodných nádobek a
uchovává se za chladu, nejlépe při -15 až -20 °C. Aktivita toho-

to preparátu při pH 6,4 a teplotě 40 °C v přítomnosti pyridinu /o konečné koncentraci 14,1 $\mu\text{mol/ml}$ / je za optimálních podmínek, tj. za nulové koncentrace reakčního produktu, 3 až 4 ukatál/mg proteinu, přičemž 1 ml odstředěného prokvašeného media obsahuje kolem 0,7 mg proteinů. Aktivita tohoto preparátu zůstává zachována při uchovávání při teplotách nižších než -10 °C více než 6 měsíců při teplotách do 30 °C více než 4 týdny. Pro stanovení thiaminu o koncentraci 0,2 až 5,0 $\mu\text{g/g}$ zředěného vzorku pomocí thiochromové metody je nejvhodnější používat 0,2 ml tohoto preparátu do celkového objemu 4,2 ml reakční směsi a dobu inkubace 30 minut při 40 °C za pH 6,4 /puřrováno citrát-fosfátovým puřrem o koncentraci 0,05 mol/l /.

Přiklad 2

Obdobná fermentační půda jako v příkladě 1 s obsahem 1 g/l kvasničného autolysatu a 4 g CaCl_2/l se fermentuje a oddělení buněk se provádí stejné jako u příkladu 1. Ze supernatantu získaného z 10 až 15 kultivačních baněk se izoluje thiaminasa I způsobem popsánym J.L.Wittliffem a R.L. Airthem /Methods in Enzymology /D.B.McCormick, L.D.Wright, eds./ 18 A, 234, 1970/ a konečný roztok enzymu se uchovává při -20 °C nebo se vysuší lyofilizací a uchovává v chladu. Stabilita roztoku je za těchto podmínek více než 6 měsíců, lyofilizovaný preparát je stabilní několik let.

Přiklad 3

10 ml živné půdy o složení uvedeném v příkladu 1 se zaočkuje kulturou *Bacillus thiaminolyticus* CCM 3599 ze šikmého agaru a inkubuje se za třepání 24 h při 33 ± 2 °C. Pak se celý objem převede do laboratorního fermentoru obsahujícího 1 500 ml sterilní půdy složení uvedeného v příkladu 1 a kultivuje se za provzdušňování 24 až 36 h při 34 ± 1 °C, načež se celý objem fermentační kapaliny převede do fermentoru obsahujícího 30 litrů živné půdy stejného složení jako v předchozím stupni a kultivuje se 48 h při 34 ± 1 °C za intenzivního

provzdušňování. Pak se fermentační kapalina zchladí, buňky se odseparují na průtokové odstředivce a čirá kapalina se zpracuje postupem uvedeným v příkladu 1 nebo 2 nebo se vysuší lyofilizací. Aktivita prokvašeného media po odstředění je 3,5 ukatal/mg proteinu, přičemž obsah proteinu v tomto mediu je 0,6 mg proteinu.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

239 033

1. Způsob fermentační výroby thiaminasy I.-thiamin:báze 2-methyl-4-aminopyrimidin-5-methenyltransferasy, EC 2.5.1.2., aerobní kultivací produkčního mikroorganismu *Bacillus thiaminolyticus* Kuno, vyznačující se tím, že se kultivace provádí ve fermentačním mediu obsahujícím jako stimulator produkce thiaminasy I. kvasničný autolysát v množství 0,2 až 30 g/l, načež se fermentační kapalina odstředí a získaný supernatant se konzervuje chemickým prostředkem nebo lyofilisuje.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se kultivace provádí ve fermentačním mediu obsahujícím ionty vápníku v množství 0,04 až 5,0 g/l.