

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

266 763

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
C 12 P 19/36

(21) PV 4301-88.Y

(22) Přihlášeno 20 06 88

(40) Zveřejněno 11 04 89

(45) Vydáno 29 06 90

(75)
Autor vynálezu

ŠILHÁNKOVÁ LUDMILA doc.ing.CSc.,
HÁJEK PETR ing., PRAHA

(54)

Způsob přípravy redukováného nikotin-
amidadenindinukleotidfosfátu

(57) Způsob přípravy redukováného nikotin-
amidadenindinukleotidfosfátu spočívá v tom,
že se na nikotinamidadenindinukleotidfosfát
působí v přítomnosti fosfátu a glukózy nebo
jejího zdroje permeabilizovanými buňkami
pravých kvasinek nebo kvasinkovitých mikro-
organismů. Zvláště výhodné je použití buněk
Rhodotorula glutinis DBM 18, uloženého ve
sbírce mikroorganismů Katedry biochemie a
mikrobiologie Vysoké školy chemicko-techno-
logické v Praze pod číslem 18, lisovaného
pekařského droždí, sušeného aktivního drož-
dí, lisovaného krmného droždí nebo odpad-
ních pivovarských nebo vinařských kvasnic.
Permeabilizované buňky mohou být imobilizo-
vány. Redukci lze provádět v přítomnosti
 Mg^{2+} a v přítomnosti inhibitorů rozvoje
mikrobiální kontaminace, např. azidu sodné-
ho nebo fluoridu sodného.

Vynález se týká způsobu přípravy a regenerace redukováného nikotinamidadenindinukleotidfosfátu /NADPH/. Nikotinamidadenindinukleotidfosfát /NADP+/ je koenzymem řady oxidoredukčních enzymů. Jeho redukováná forma se používá v analytické chemii, v biochemickém výzkumu a při enzymové přípravě některých organických sloučenin.

Až dosud se získával hlavně enzymovou redukcí nikotinamidadenindinukleotidfosfátu /NADP+/ pomocí izolovaných enzymů, např. pomocí glukosa-6-fosfátdehydrogenasy /EC 1.1.1.49/, karboxylační malátdehydrogenasy /EC 1.1.1.40/, isocitrátdehydrogenasy /EC 1.1.1.42/ nebo glukosadehydrogenasy /E.C. 1.1.1.47/. Nevýhodou těchto postupů je velká spotřeba izolovaných enzymů a v některých případech také vysoká cena jejich substrátů /tj. glukosa-6-fosfátu a isocitrátu/. Při použití hrubého izolátu malátdehydrogenasy z bakteriálních buněk /Saye S., Yokoyama S., Enzyme Microbiol. Technol. 7, 418, 1985/ je nevýhodou velmi dlouhá reakční doba /5h/. Použití izolovaných enzymů bylo navrženo také pro regeneraci redukováných koenzymů během preparativní syntézy, neboť použití těchto koenzymů ve stechiometrických množstvích by bylo příliš nákladné. Elektrochemická regenerace je totiž neslučitelná s mnoha biochemickými systémy, má nízkou selektivitu a vyžadovala by složitou aparaturu, navíc se elektrody velmi rychle opotřebovávají. Také chemická a fotocnemická regenerace má omezenou použitelnost v biochemických systémech a další nedostatky /nízká rychlost a výtěžek a v případě fotochemické regenerace ještě omezená stabilita systému a složitá aparatura/. Cenovou nevýhodu použití izolovaných enzymů odstraňuje použití permeabilizovaných mikrobiálních buněk jako zdroje enzymů redukujiících nikotinamidadenindinukleotidfosfát. Až dosud byly k tomuto účelu používány přísně anaerobní mikroorganismy. Tak Eguchi S. Y. a sp. /Agric. Biol. Chem. 47, 2941, 1983/ používají methabogenní bakterie za použití mravenčanu nebo plynného vodíku jako substrátu s výtěžností přeměny kolem 60 %. Matsunaga /Jap. pat. 86 56 090 z r. 1986/ dosahuje při použití anaerobního druhu *Clostridium butyricum* a tlaku plynného vodíku 10 MPa po 9 h rovněž pouze 60 % konverze nikotinamidadenindinukleotidfosfátu v jeho redukovanou formu. Práce s přísně anaerobními mikroorganismy a použití plynného vodíku představuje značné technologické komplikace.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob přípravy redukováného nikotinamidadenindinukleotidfosfátu podle vynálezu, který spočívá v tom, že se na nikotinamidadenindinukleotidfosfát ve vhodném pufru působí permeabilizovanými buňkami kvasinek nebo kvasinkovitých mikroorganismů v přítomnosti fosfátu a glukosy nebo jejího endogenního nebo exogenního zdroje, např. škrobového sirupu, hydrolyzátu celulozy nebo dřeva. Velmi výhodné je použití příslušníků rodů *Saccharomyces* Meyen ex. Reess, *Candida* Berkhout a *Rhodotorula* Harrison. S výhodou lze použít lisované pekařské droždí nebo aktivní sušené droždí; dále lisované krmné droždí a odpadní pivovarské nebo vinařské kvasnice. Zvláště výhodné je použití buněk *Rhodotorula glutinis* DBM 18, uložené ve sbírce mikroorganismů Katedry biochemie a mikrobiologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze pod číslem 18. Permeabilizované buňky mohou být také imobilizovány.

Redukce nikotinamidadenindinukleotidfosfátu pomocí permeabilizovaných buněk kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů podle vynálezu se provádí tak, že se buňky zvoleného mikroorganismu pomnoží v tekutém médiu obsahujícím vedle vhodného zdroje uhlíku a energie také zdroje dusíku ve formě amonné soli, kvasničného extraktu /autolyzátu/, peptonu nebo jiného přirozeného zdroje tohoto prvku, dále hořečnaté a draselné ionty, fosfát a sulfát. Buňky se oddělí od pomnožovacího média, nejlépe odstředěním, a podle potřeby promyjí vodou. Permeabilizace buněk se dosáhne buď třepáním s acetonem, toluenem nebo jiným rozpouštědlem, nebo působením vhodné povrchově aktivní látky /např. dodecylsulfátu, cetyltrimethylamoniumbromidu ap./, nebo opakovaným zmražením a rozmrazováním. Pro

266763

imobilizaci buněk se může použít vhodný gel, jako je polyakrylamid, genu-carrageenan, epoxidový polymer apod. Permeabilizace buněk může být aplikována před jejich imobilizací nebo až po ní.

Přeměna nikotinamidadenindinukleotidfosfátu v jeho redukovanou formu probíhá v reakční směsi obsahující 0,2 až 30 mM nikotinamidadenindinukleotidfosfát, 0 až 200 mM Mg^{2+} , 0 až 20 mM Zn^{2+} , 0 až 8 % hmot. glukosy, 0,05 až 6,5 % hmot. metafosfátu nebo ortofosfátu a volné nebo imobilizované permeabilizované kvasinkové buňky v množství 2 až 120 mg buněčné sušiny/ml reakční směsi. Pro potlačení rozvoje kontaminace u opakovaně používaných buněk je možno přidat azid sodný NaN_3 v množství 0,1 až 3 mmol/dm³ nebo 10 až 300 mmol/dm³ fluoridu sodného NaF. Substráty, aktivátory a inhibitory se rozpouštějí ve vhodném pufru o pH 7,5 až 11,0. Reakční teplota se volí v rozmezí 10 až 50°C.

Po proběhnutí reakce se reakční kapalina oddělí od kvasinkových buněk, např. odstředěním, dekantací nebo filtrací a izoluje se z ní některým ze známých postupů redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát. Výtěžky tohoto produktu při použití různých druhů kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů jsou uvedeny v tab. 1.

Použije-li se způsob přípravy redukovaného nikotinamidadenindinukleotidfosfátu podle vynálezu pro jeho regeneraci při preparativní redukci určité sloučeniny pomocí oxidoreduktasového enzymového systému, jenž vyžaduje tento redukovaný koenzym, volí se reakční směs vyhovující této preparativní redukci a obsahující výše uvedené složky potřebné pro redukci nikotinamidadenindinukleotidfosfátu. Po proběhnutí reakce a odstranění buněk se z reakční směsi izoluje žádaný produkt. Permeabilizované kvasinkové buňky lze použít opakovaně. V některých případech lze zbývající substrát po izolaci žádaného produktu rovněž použít opakovaně, po obohacení o potřebné složky.

Vynález je v dalším blíže objasněn na konkrétních příkladech přípravy redukovaného nikotinamidadenindinukleotidfosfátu za použití kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů.

Příklad 1

Rhodotorula glutinis DBM 18 se aerobně kultivuje při 28 až 30°C v prostředí o pH 5,8 obsahujícím v 1 litru: 10,0 g glukosy, 5,0 g sušeného kvasničného autolyzátu a 5,0 g enzymového hydrolyzátu kaseinu. Po 18 h kultivace se buňky odstředí, promyjí vodou a vysuší na vzduchu. Pak se permeabilizují čtyřnásobným hmotnostním množstvím vychlazeného acetonu, po odstředění se aceton slije a jeho residua se odstraní proudem vzduchu. K reakční směsi 10 mM nikotinamidadenindinukleotidfosfátu a 10 mM $MgCl_2$, 3% hmot. kyseliny metafosforečné zneutralizované pomocí M NaOH, 5 % hmot. glukosy, 1 mM NaN_3 v tris-HCl pufru o pH 10,0 se přidají permeabilizované buňky v množství 30 mg buněčné sušiny/ml a inkubuje se za mírného třepání 1,75 h při 30°C. Během této doby dojde k přeměně 85 až 98 % nikotinamidadenindinukleotidfosfátu /NADPH/ v jeho redukovanou formu a pouze 0,2 až 0,8 % se přemění v redukovaný nikotinamidadenindinukleotid /NADH/. Buňky se od reakční směsi oddělí centrifugací při 600 až 800 g a mohou se použít pro další podíl reakční směsi. Ze supernatantu se některým ze známých postupů izoluje redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát. Z odpadních buněk lze jednoduchou extrakcí získat provitamin A pro veterinární účely.

Příklad 2

Lisované pekařské droždí se vysuší na vzduchu při teplotě do 33°C a imobilizuje se sucha do epoxidového polymeru dianového typu připraveného z epoxidové pryskyřice a ω , ω -diaminopolyethylenoxidu podle postupu Veruoviče B. a sp. /AO č. 217 857/. Polymerační reakce probíhá 8 h při 35°C. Pak se získaný heterogenní biokatalyzátor, obsahující 25 % hmot. kvasničné sušiny, rozkrájí na krychličky o hraně cca 1 mm a třepe 15 min. s vychlazeným acetonem. Pak se aceton slije, katalyzátor se promyje 0,2 M tris-HCl pufrům o pH 9,5

a použije pro reakční směs obsahující 5 mM NADP⁺, 5 mM MgCl₂, 1 mM NaN₃, 0,1 M NaF, 3% hmot. metafosfátu a 2 % hmot. glukosy v takovém množství, aby buněčná sušina činila 30 mg/ml, a inkubuje se za mírného míchání 70 min při 28°C. Po proběhnutí reakce se reakční směs slije a biokatalyzátor se použije znovu ve stejném objemu reakční směsi stejného složení jako při prvním použití, avšak s přidavkem glukosy v konečné koncentraci 4 % hmot.

Přeměna nikotinamidadeninukleotidfosfátu /NADP⁺/ v jeho redukovanou formu /NADPH/ pomocí permeabilizovaných buněk různých druhů kvasinek a kvasinkovitých mikroorganismů

Použitý mikroorganismus, pH reakční směsi	konc.buněk /mg suš./ml/	reakční dobu /h/	počát.konc. NADP /mM/	konečné konc. trace		výtěžek NADPH / % /
				NADPH /mM/	NADH /mM/	
Rhodotorula glutinis DBM 18						
pH 10,0	27	0,75	5	4,8	0,04	96,7
pH 10,0	27	1,5	10	8,0	ne-	85 +/
pH 10,0	27	2,25	20	12,0	stano-	60,0+ /
pH 10,0	27	2,25	30	14,5	veno	48+ /
Rhodotorula glutinis DBM 16						
pH 9,0	24,1	1,0	5	4,5	0,07	89,1
Rhodotorula glutinis DBM 17						
pH 9,0	24,2	1,0	5	4,0	0,05	79,4
Saccharomyces cerevisiae BMA VII /lisov.pekařské droždí, Kolín/, pH 9,5	30	0,75	5	4,9	0,11	98,9
S.cerevisiae /dř.S.uvarum, pivovarská kvasinka, Budvar/						
pH 10,0	30	0,75	5	2,8	0,00	55,6+ /
Candida utilis DFCHT 36						
pH 10,0	30	0,75	5	2,2	0,22	43,5+ /

+ / Konverze ještě stoupá, nutno prodloužit reakční dobu

1. Způsob přípravy redukovaného nikotinamidadenindinukleotidfosfátu z nikotinamidinukleotidfosfátu, vyznačující se tím, že se na nikotinamidadenindinukleotidfosfát působí permeabilizovanými buňkami pravých kvasinek nebo kvasinkovitých mikroorganismů v přítomnosti fosfátu, glukosy nebo jejího vhodného endogenního nebo exogenního zdroje, popřípadě hořečnatých a zinečnatých iontů, při pH 7,2 až 11.
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se na nikotinamidadenindinukleotidfosfát působí permeabilizovanými buňkami druhu *Rhodotorula glutinis* DBM 18.
3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se na nikotinamidadenindinukleotidfosfát působí permeabilizovanými buňkami lisovaného pekařského droždí, aktivního sušeného droždí, lisovaného krmného droždí, například *Candida utilis* nebo odpadních pivovarských nebo vinařských kvasnic, například *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* a *Saccharomyces bayanus*.
4. Způsob podle bodu 1 až 3, vyznačující se tím, že se na nikotinamidadenindinukleotidfosfát působí imobilizovanými permeabilizovanými buňkami.
5. Způsob podle bodu 1 až 4, vyznačující se tím, že zdrojem glukosy je škrobový sirup nebo hydrolyzát celulózy nebo dřeva.
6. Způsob podle bodu 1 až 5, vyznačující se tím, že se redukce nikotinamidadenindinukleotidfosfátu provádí v přítomnosti inhibitorů rozvoje mikrobiální kontaminace, například azidu sodného nebo fluoridu sodného.
7. Způsob podle bodu 1 až 6, vyznačující se tím, že se redukce nikotinamidadenindinukleotidfosfátu provádí během preparativní redukce, vyžadující redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát.