

Spôsob prípravy koncentrátov invertázy

MARGITA OBERNAUEROVÁ – JÚLIUS ŠUBÍK

Súhrn. Preskúmali sa podmienky izolácie a purifikácie invertázy z rekombinanta kvasiniek *S. cerevisiae* CCY 22-15-11 hyperproduktujúceho tento enzým. Invertáza sa dala uvoľniť z buniek do roztoku autolýzou, enzýmovým natrávením buniek alebo ich mechanickou dezintegráciou. Odcentrifugovaním bunkových stien a iných štruktúr sa vzniknutý cytosol relatívne obohatil o invertázu tepelnou denaturáciou a izoelektrickou precipitáciou balastných bielkovín, resp. ich selektívnym vysolením nasýteným síranom amónnym. Ultrafiltráciou a následnou dialýzou cytosolu sa odstránili i nízkomolekulové látky, čím sa získali enzýmové koncentráty invertázy aktivity rádovo 10^3 U.ml⁻¹, resp. 10^5 U.g⁻¹ bielkovín, ktoré sa dajú použiť v potravinárskom priemysle.

Invertáza (β -D-fruktofuranozidáza EC 3.2.1.26) je extracelulárny enzým nachádzajúci sa v periplazmatickom priestore niektorých druhov kvasiniek, ktoré môžu využívať sacharózu ako zdroj uhlíka a energie. Tento enzým hydrolyzuje koncové neredukujúce β -D-fruktofuranozidové zvyšky v β -D-fruktofuranozidoch za vzniku monosacharidov glukózy a fruktózy, ktoré sa transportujú membránou a ďalej metabolizujú vo vnútri bunky [1, 2].

Invertáza sa v bunkách kvasiniek vyskytuje vo forme externého glykoproteínu [3, 4], jeho prekursora viazaného na membránu [5] i ako cytoplazmatický neglykozylovaný proteín [6, 7].

Bohatým zdrojom invertázy sú pekárske kvasinky, najmä kmene schopné nadprodukcie tohto enzýmu. Obsah invertázy v kvasinkách hyperproduktívnych kmeňov predstavuje asi 1 % celkových bunkových proteínov [8]. Podstatná časť invertázy je lokalizovaná na vonkajšej strane cytoplazmatickej membrány [9] a zúčastňuje sa 94–99 % na celkovej aktivite enzýmu kvasiniek vyrastených za derepresných podmienok [8].

Enzým v izolovanej alebo imobilizovanej forme, ako aj jeho aktivita v kvasinkách sú významné z biotechnologického hľadiska vo viacerých odboroch

potravinárskeho priemyslu. V súčasnosti sa do ČSSR iba dováža. V literatúre sú opísané rôzne spôsoby jeho uvoľnenia a izolácie z buniek mikroorganizmov [3, 5, 10–13].

Predmetom tejto práce bolo vypracovať postup izolácie a purifikácie enzýmového koncentrátu invertázy z hyperprodukčného kmeňa kvasiniek *S. cerevisiae* CCY 15-22-11, vyšľachteného v našom laboratóriu, ktorý by bral do úvahy všetky špecifické vlastnosti enzýmu i jeho producenta.

Materiál a metódy

V práci sa použil vyšľachtený kmeň kvasiniek *S. cerevisiae* M2A (CCY 22-15-11) nadproduktujúci invertázu [14].

Kultivačné podmienky a metódy stanovenia aktivity invertázy [15] sú podrobne opísané v predchádzajúcej práci [14].

Výsledky a diskusia

Uvoľnenie invertázy z buniek kvasiniek do roztoku

Invertázu možno pomerne kvantitatívne uvoľniť do roztoku mechanicky, enzymaticky alebo autolyticky. Ďalej uvádzame typické experimentálne postupy využívajúce všetky tri spôsoby uvoľnenia invertázy do roztoku v prípade hyperprodukčného kmeňa rekombinanta kvasiniek *S. cerevisiae* M2A. Uvádzané hodnoty výťažnosti sú priemerom troch až desiatich experimentov.

Uvoľnenie invertázy mechanickou dezintegráciou buniek. 24-hodinovým inokulom kmeňa kvasiniek *S. cerevisiae* M2A (0,1 ml/100 ml kultivačného média) sa naočkovalo polosyntetické médium [14] s obsahom glukózy 5 g.l⁻¹. Bunky sa kultivovali za trepania pri 30 °C v troch 5000 ml Erlenmeyerových bankách naplnených do 1/10 objemu rastovým médiom. Kultúra kvasiniek po dorastení do stacionárnej fázy sa scentrifugovala (10 min pri 1500 g), dvakrát premyla destilovanou vodou a suspendovala do minimálneho objemu približne 20 ml. Do takto pripravenej vodnej suspenzie buniek sa pridalo optimálne množstvo (50 g) balotinových gulôčok vychladených na 0 °C a v 75 ml kyvette v Braunovom homogenizátore sa suspenzia mechanicky homogenizovala 3 minúty za ochladenia tekutým CO₂, čím sa dosiahla 95 % dezintegrácia bu-

niek. Z takto upravenej suspenzie sa balotina odstránila filtráciou cez sklený filter F_2 za podtlaku. Z uvedeného množstva vypestovanej kvasinkovej kultúry sa získal bezbunkový homogenát, ktorý po doplnení destilovanou vodou na objem 100 ml obsahoval v priemere 36 mg suchej hmotnosti kvasiniek v 1 ml suspenzie.

Homogenát sa scentrifugoval 10 minút pri 1500 g. Získaný supernatant označovaný ako cytosol obsahoval v priemere 70 % celkovej aktivity invertázy. Výťažnosť invertázy v tejto frakcii bolo možné ďalej zvýšiť niekoľkonásobným premytím sedimentu bunkových stien, resp. bunkových štruktúr a spojením tekutých frakcií s cytosolom. Cytosol slúžil ako základná surovina, z ktorej sa invertáza izolovala ďalšími vhodnými purifikačnými postupmi.

Enzymové uvoľnenie invertázy do roztoku. Kultúra hyperprodukčného kmeňa kvasiniek *S. cerevisiae* M2A sa dopestovala uvedeným spôsobom, dvakrát premyla destilovanou vodou a suspendovala do objemu 200 ml roztokom, ktorý obsahoval Tris-HCl ($0,1 \text{ mol.l}^{-1}$) pH 8,0 a 2-merkaptetoetanol koncentrácie 1 g/100 ml. Po 10 minútach inkubácie pri laboratórnej teplote sa bunky scentrifugovali, premyli destilovanou vodou a suspendovali do celkového objemu 100 ml destilovanej vody obsahujúcej lyofilizovaný enzymový výťažok zo žalúdka slimákov (2 g/100 ml). Po dvoch hodinách inkubácie pri 30 °C, keď už suspenzia obsahovala menej ako 2 % pôvodného počtu intaktných buniek, centrifugáciou 10 minút sa pri 1500 g získal supernatant – cytosol, z ktorého sa invertáza ďalej izolovala vhodnými purifikačnými postupmi. Enzymovým narušením bunkových stien externe pridanými glukonázami prešlo do cytosolovej frakcie priemerne 80 % celkovej aktivity invertázy kvasinkových buniek.

Autolytický spôsob uvoľnenia invertázy do roztoku. Kultúra kvasiniek *S. cerevisiae* M2A dopestovaná už uvedeným spôsobom, sa dvakrát premyla destilovanou vodou. Autolýza prebehla za dvojakých podmienok, pričom druhý spôsob sa dá použiť aj v podmienkach potravinárskeho priemyslu. V prvom prípade médium obsahovalo v celkovom objeme 30 ml bunky kvasiniek (25 g suchej hmotnosti /100 ml), acetát sodný (2 g/100 ml) a toluén (5 ml/100 ml) [11].

V druhom prípade médium obsahovalo v celkovom objeme 30 ml bunky kvasiniek (25 g suchej hmotnosti/100 ml), chlorid sodný (5 g/100 ml) a etanol (5 ml/100 ml) [16].

Autolýza prebiehala 24 hodín pri 50 °C za miešania. Po skončení autolytického procesu centrifugáciou 10 minút pri 1500 g sa získal cytosol obsahujúci invertázu.

V porovnaní s predchádzajúcimi spôsobmi uvoľnenia enzýmu do roztoku (tab. 1) autolytickým spôsobom za daných podmienok prešlo do cytosolickej frakcie v prípade toluénovej autolýzy 35 % pôvodnej celkovej aktivity inver-

Tabuľka 1. Podiel invertázy v cytosolovej frakcii z pôvodného obsahu v homogenáte *S. cerevisiae* M2A (100 %) po centrifugácii v závislosti od použitej metódy dezintegrácie buniek
 Table 1. Invertase portion in cytosol fraction from the original content in the homogenate *S. cerevisiae* M2A (100%) after centrifugation in the dependence on used method of cell disintegration

Postup dezintegrácie	Výťažnosť invertázy
	(% celkovej aktivity) ²
Mechanická dezintegrácia ³	70
Enzymové rozrušenie bunkových stien ⁴	80
Autolytické rozrušenie bunkových stien ⁵	
v prítomnosti etanolu ⁶	23
v prítomnosti toluénu ⁷	35

¹Mode of disintegration; ²Yield of invertase/percentage of the total activity); ³Mechanical disintegration; ⁴Enzymatic destruction of cell walls; ⁵Autolysis; ⁶In the presence of ethanol; ⁷In the presence of toluene.

tázy kvasiniek a v prípade etanolovej autolýzy iba 23 %. Pri nezmenenej celkovej výťažnosti sa po desaťnásobnom zahutnení získaného cytosolu ultrafiltráciou cez membrány neprepúšťajúce látky molekulovej hmotnosti viac ako 40 000 získali enzymové koncentráty invertázy špecifickej aktivity 60–140 U.mg⁻¹ suchej hmotnosti pri objemovej aktivite 3.10³ až 5.10³ U.ml⁻¹.

Purifikácia invertázy uvoľnenej z buniek kvasiniek do roztoku

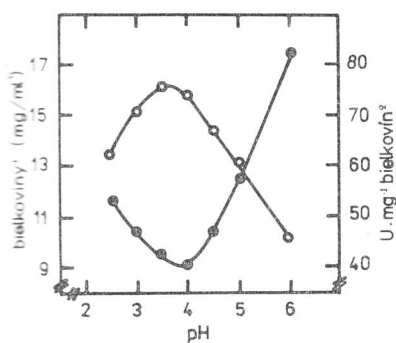
Cytosolová frakcia získaná ako supernatant centrifugáciou homogenátu mechanicky, resp. enzymaticky rozrušenej kvasinkovej biomasy sa použil ako základný materiál, z ktorého sa vhodnými purifikačnými postupmi izolovala invertáza. Okrem nej cytosol obsahoval viaceré bielkoviny a iné enzýmy, nukleové kyseliny a nízkomolekulové látky, ktoré bolo treba ďalej oddeliť.

Pre purifikáciu invertázy z cytosolu pripadali do úvahy tri alternatívne postupy. Prvý postup sa zakladá na izoelektrickej precipitácii balastných bielkovín, druhý používa denukleinizáciu, tepelnú denaturáciu a izoelektrickú precipitáciu balastných bielkovín a tretí vysolenie balastných bielkovín, sedimentácii ktorých glykoproteíny invertázy ostávajú v supernatante.

Stanovením závislosti množstva vyvráňaných celkových bielkovín, resp. invertázy od pH prostredia sa zistilo, že za daných experimentálnych podmienok

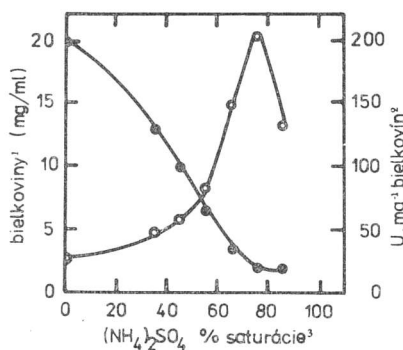
nok maximum celkových bielkovín sa vytráža pri pH 4,0, pričom väčšina invertázy zostáva v roztoku za súčasného zvýšenia špecifickej aktivity, ktorá nadobúda maximum pri pH 3,75 (obr. 1). Úpravou pH cytosolu na 3,8 sa vytrážalo a prešlo do sedimentu 45 % bielkovín, kým pri 40 % retencii invertázy v supernatante sa jej špecifická aktivita zvýšila 2,9-krát.

Druhý spôsob purifikácie invertázy z cytosolu berie do úvahy postup prípravy kvasinkových bielkovín pre ľudskú výživu [17] a okrem izoelektrickej precipitácie bielkovín využíva aj denukleinizáciu cytosolu a tepelnú denaturáciu balastných bielkovín. Inkubáciou cytosolu 2 hodiny pri 50 °C za miešania pri pH 6,0 dochádza k hydrolýze nukleových kyselín a denaturácii termolabilných bielkovín, ktoré sa po úprave pH cytosolu na 3,8 odstránili centrifugáciou 10 minút pri 3000 g. Získal sa supernatant obsahujúci 35 % celkovej aktivity invertázy homogenátu buniek špecifickej aktivity 63,13 U.mg⁻¹ bielkovín.



Obr. 1. Závislosť množstva izoelektricky vytrážených bielkovín (●), resp. špecifickej aktivity invertázy (○) od pH cytosolu. Cytosol mechanicky dezintegrovaných buniek *S. cerevisiae* M2A sa rozdelil na alikvotné frakcie, ktorých pH sa upravilo na vyznačenú hodnotu. Vytrážené bielkoviny sa oddelili centrifugáciou a supernatant sa podrobil analýze bielkovín a aktivity invertázy.

Fig. 1. Quantitative dependence of isoelectric precipitated proteins (●) or specific invertase activity (○) on cytosol pH. Cytosol from mechanically disintegrated cells *S. cerevisiae* M2A was divided into aliquot fractions, and their pH was adjusted to indicated value. Precipitated proteins were separated by centrifugation and supernatant was analysed for proteins and invertase activity. (¹Proteins (mg ml⁻¹); ²U mg⁻¹ of proteins.)



Obr. 2. Závislosť úbytku celkových bielkovín (●) a zvýšenia špecifickej aktivity invertázy (○) v supernatante získanom po vysolení od stupňa nasýtenia cytosolu síranom amónnym. Cytosol sa pripravil mechanickou dezintegráciou buniek *S. cerevisiae* M2A.

Fig. 2. Dependence of total protein decrease (●) as well as invertase activity increase (○) in supernatant after salting out on the degree of cytosol saturation with ammonium sulfate. Cytosol was prepared by mechanical disintegration of *S. cerevisiae* M2A cells. (¹,²As in Fig. 1; ³Saturation percentage.)

Tabuľka 2. Špecifická aktivita invertázy *S. cerevisiae* M2A v jednotlivých frakciách pri použití rôznych purifikačných postupov
 Table 2. Specific invertase activity of *S. cerevisiae* M2A in respective fractions after various purifying procedures

Frakcia ¹	Špecifická aktivita invertázy [U.mg ⁻¹ bielkovín] ²	Výťažnosť [%] ³
Homogenát ⁴	34,5	100
Cytosol ⁵	36,4	70
Supernatant po izoelektrickom zrážaní ⁶	72,8	40
Supernatant po denukleinizácii, tepelnej denaturácii a izoelektrickom zrážaní ⁷	63,1	35
Supernatant po vysolení (NH ₄) ₂ SO ₄ ⁸	206,0	50

¹Fraction; ²Specific invertase activity (U mg⁻¹ of protein); ³Yield; ⁴Homogenate; ⁵Cytosol; ⁶Supernatant after isoelectric precipitation; ⁷Supernatant after denucleization, thermal denaturation and isoelectric precipitation; ⁸Supernatant after salting out with (NH₄)₂SO₄.

Pri štúdiu vlastností invertázy rekombinanta M2A sa v zhode s literatúrou [3, 8, 18] zistilo, že glykoproteín externej invertázy je relatívne rezistentný proti vysolovaciemu účinku síranu amónneho. K rovnakým objemom cytosolu sa preto pridal síran amónny v množstvách, ktoré zodpovedali rôznym percentám nasýtenia cytosolu touto soľou. V priebehu 4 hodín pri 5 °C došlo za miešania k vysoleniu bielkovín, ktoré sa odstránili centrifugáciou 10 minút pri 10 000 g. V získanom supernatante sa stanovila aktivita invertázy a koncentrácia bielkovín. Sledovaním závislosti špecifickej aktivity invertázy supernatantu od stupňa saturácie cytosolu síranom amónnym sa zistilo, že pri 75 % nasýtení cytosolu (NH₄)₂SO₄ sa vysolí až 90 % celkových bielkovín, pričom väčšina invertázy zostala v supernatante a jej špecifická aktivita dosiahla maximum (obr. 2). Takto sa získal enzýmový koncentrát obsahujúci 50 % celkovej invertázy homogenátu kvasinkových buniek a jeho špecifická aktivita bola 206 U.mg⁻¹ bielkovín.

Uvedenými tromi purifikačnými postupmi sa získal supernatant enzýmového koncentrátu viacnásobne obohateného o invertázu (tab. 2). Takýto supernatant zahustený na desatinu svojho pôvodného objemu ultrafiltráciou je relatívne obohatený bielkovinou invertázy proti nízkomolekulovým látkam resp. soľam prechádzajúcim ultrafiltračnou membránou. Špecifickú aktivitu invertázy možno ďalej zvýšiť, a to gélovou chromatografiou, dialýzou, resp. diafiltráciou na ultrafiltru. Roztoky enzýmu možno potom stabilizovať glycerolom alebo inými polyhydričnými alkoholmi [19]. V našich modelových experi-

mentoch za použitia ultrafiltračných membrán neprepúšťajúcich látky molekulovej hmotnosti väčšej ako 40 000 sa postupom využívajúcim vysolovací efekt síranu amónneho získali enzýmové koncentráty invertázy prevyšujúce aktivitu 6500 U.ml⁻¹, resp. 200 U.mg⁻¹ bielkovín. Preparáty tejto aktivity sa dajú porovnať s aktivitami komerčných prípravkov firiem Serva alebo Sigma, sú však viac ako päťnásobne aktívnejšie ako invertáza G10x pripravená vo Všeživázovom vedeckovýskumnom ústave aplikovanej enzymológie v ZSSR.

Pre priemyselnú výrobu invertázy je vyšľachtený kmeň *S. cerevisiae* M2A (CCY 15-22-11) výhodnejší vzhľadom na vysokú špecifickú aktivitu tohto enzýmu (16 U.mg⁻¹ suchej hmotnosti) ako bežné priemyselné kmene pekárskych kvasiniek, ktorých špecifická aktivita je okolo 2 U.mg⁻¹ suchej hmotnosti. Na zavedenie priemyselnej výroby enzýmových prípravkov invertázy niektorým zo skúmaných experimentálnych postupov budú smerodajné výsledky štvrtprevádzkových experimentov a dostupnosť zodpovedajúcich zariadení, resp. surovín. Iba ekonomický rozbor výsledkov týchto pokusov môže dať definitívnu odpoveď na výber najoptimálnejšieho izolačného, resp. purifikačného postupu, pretože každý má svoje prednosti i nedostatky. Berúc do úvahy možnosti komplexného využitia kvasničnej biomasy, výťažnosť i efektívnosť purifikačného postupu, mechanická dezintegrácia buniek, vysolenie balastných bielkovín a ultrafiltrácia sa ukazujú ako najoptimálnejšie technologické procesy. Rovnako lákavé je aj využitie supernatantu po denukleizácii a oddelení bielkovín (SCP) izoelektrickou precipitáciou v procese komplexného spracovania kvasničnej biomasy.

Literatúra

- [1] MYRBÄCK, K., In: The Enzymes. Part A. Invertases. Eds. J.B. Sumner, K. Myrback. New York, Academic Press 1960, s. 379.
- [2] REED, G. – UNDERKOFER, L.A., Enzymes in Food Processing. New York-London, Academic Press 1966.
- [3] NEUMANN, N.P. – LAMPEN, J.O., Biochemistry, 6, 1967, s. 468.
- [4] SUTTON, P.D. – LAMPEN, J.O., Biochim. Biophys. Acta 56, 1962, s. 303.
- [5] BABCZIŃSKI, P., Biochim. Biophys. Acta, 64, 1980, s. 121.
- [6] GASCON, S. – LAMPEN, J.O., J. Biol. Chem., 243, 1968, s. 1567.
- [7] BETETA, P. – GASCON, S., FEBS Lett., 13, 1971, s. 297.
- [8] WILLIAMS, R.S. – TRUMBLY, R.J. – MacCOLL, R. – TRIMBLE, R.B. – MALEY, F., J. Biol. Chem., 260, 1985, s. 13334.
- [9] PREISS, J.W., Arch. Biochem. Biophys., 75, 1958, s. 186.
- [10] LAMPEN, J.O., In: The Enzymes. Vol. 5. Ed. P.D. Boyer. New York, Academic Press 1971, s. 291.
- [11] NATULAJTITE, E.J. – AVIZMENIS, V.J. – JANULAITENE, A.K. – GEGUZMENE, A. A., Prikl. Biochim. Mikrobiol., 16, 1980, s. 528.

- [12] GOLDSTEIN, A. – LAMPEN, J.O., Meth. Enzym., 42, 1975, s. 504.
- [13] PEPLER, M.J., Econ. Microbiol., 7, 1982, s. 293.
- [14] OBERNAUEROVÁ, M. – ŠUBÍK, J., Bull. PV 27 (7) č. 3, 1988, s.
- [15] GROSSMANN, M.K. – ZIMMERMANN, F.K., Mol. Gen. Genet., 175, 1979, s. 223.
- [16] KIKKOMANSHOYU Co., Brit. 1445885.
- [17] FENCL, Z. – MACHEK, F. – ŠILINGER, V., Czech. 161299.
- [18] TRIMBLE, R.B. – MALEY, F., J. Biol. Chem., 252, 1977, s. 4409.
- [19] COMBES, D. – MONSAN, P., Ann. N.Y. Acad. Sci., 110, 1985, s. 61.

Способ приготовления концентратов инвертазы

Резюме

В работе были обследованы условия изоляции и очистки инвертазы из рекомбинанта дрожжей *S. cerevisiae* CCY 22-15-11 гиперпроизводящего этот фермент. Инвертаза была выделена из клеток в раствор автолизом ферментативным пищеварением клеток или их механическим распадом. Цитоплазматический простор возникший центрифугированием клеточных стенок и других структур относительно обогатился инвертазой термической денатурацией и изоэлектрической преципитацией балластных белков а также их селективным высаливанием насыщенным сульфатом аммония. Ультрафильтрацией и последующим диализом цитоплазматического простора были устранены и низкомолекулярные вещества, чем были достигнуты ферментативные концентраты инвертазы с активностью 10^3 У.мл⁻¹ а также 10^5 у.г⁻¹ белков используемых в пищевой промышленности.

Mode of invertase concentrates production

Summary

Conditions for isolation and purification of invertase from the yeast recombinant *S. cerevisiae* CCY 22-15-11 hyperproducing this enzyme have been investigated. Autolysis or enzymatic digestion of cells or mechanical disintegration were used for the transition of invertase from cells into a solution. Cytosol which has been obtained after the centrifugation of cell debris and other structures was enriched with invertase by the thermal denaturation or by isoelectric precipitation of other proteins, or by their selective precipitation using the saturated ammonium sulfate. Low-molecular substances were eliminated through ultrafiltration, then dialysis was used. Thus, the enzyme concentrates of invertase, utilizable in food industry, with the activity in order 10^3 U ml⁻¹ or 10^5 Ug⁻¹ proteins were obtained.