

Izolácia a biochemická charakterizácia glukózaoxidázy *Aspergillus niger* pre potravinárske a analytické využitie

MIROSLAV STREĎANSKÝ – GABRIELA CÍFERSKÁ – ERNEST ŠTURDÍK – ZOLTAN BARÁTH – MICHAL ROSENBERG – JOZEF KOČAN
– VLADIMÍR MASTIHUBA

Súhrn. Riešila sa problematika izolácie glukózaoxidázy z mycélia *Aspergillus niger* po glukónovej fermentácii. Z vyskúšaných metód dezintegrácie mycélia sa ako najvhodnejšia ukázala vysokotlaková homogenizácia a mletie na kotúčom korundovom dezintegrátore. Na izoláciu glukózaoxidázy zo získaného extraktu sa použila etanolová precipitácia, pričom podmienky sa optimalizovali na hodnoty 15 °C, pH ba 56 % obj. etanolu. Ďalej sa porovnávali tri spôsoby purifikácie hrubého preparátu. Najlepšie výsledky sa dosiahli pri použití iónovej hydrofóbnej chromatografie na Amberlite CG-50.

Získaný preparát sa charakterizoval čo do hodnoty optimálneho pH, teploty, substrátovej špecifity, ako aj citlivosti na vplyv etanolu a NaCl.

V posledných desaťročiach sa zaznamenáva čoraz väčší a rýchlejší rozmach výroby a použitia mikrobiálnych enzýmov. K nim patrí glukózaoxidáza, ktorá sa v priemyselnom meradle získava najmä z vláknitých húb rodov *Aspergillus* a *Penicillium* [1] a má široké spektrum využitia v potravinárstve a analytike [2].

Spôsob izolácie enzýmu závisí od jeho lokalizácie v bunke, i od jeho štruktúry, ktorá určuje vlastnosti enzýmu. Glukózaoxidáza (β -D-glukóza: O_2 -oxidoreduktáza EC 1.1.3.4) z *Aspergillus niger* je intracelulárny enzým katalyzujúci oxidáciu glukózy na kyselinu glukónovú [3]:



Vznikajúci peroxid kataláza rozkladá na vodu a kyslík, čím je bunka chránená pred jeho účinkom. Oba enzýmy sú lokalizované v peroxizómoch. Glukózaoxidáza z *Aspergillus niger* je glykoproteín pozostávajúci z dvoch identických polypeptidových reťazcov, každý relatívnej molekulovej hmotnosti

Ing. Miroslav Stredanský, Ing. Michal Rosenberg, CSC., doc. Ing. Ernest Šturdík, CSC., Ing. Vladimír Mastihuba, Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Ing. Gabriela Ciferská, doc. Ing. Zoltán Baráth, CSc., Západoslovenské hydinnárske závody, š. p., Staromestská 1, 917 00 Trnava, n. p., Trnava, 919 65 Dolná Krupá.

80 000. Z týchto reťazcov obsahuje každý jednu molekulu železa a jednu molekulu flavínadenínkinukleotidu (FAD) [4]. Celkový obsah proteínu v molekule glukózaoxidázy je 74 %, okrem toho obsahuje 16 % neutrálnych sacharidov a 2 % aminosacharidov [4–7]. Molekula glukózaoxidázy vykazuje absorpčné maximá pri 278, 383 a 452 nm. Mólový absorpčný koeficient pri 450 nm je $1,41 \cdot 10^4 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Sedimentačný koeficient je 8,00 S, difúzny koeficient vo vode je $4,12 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ [8]. Izoelektrický bod glukózaoxidázy je pri pH 4,2 [9].

Glukózaoxidázu ako intracelulárny enzým získavame z mycélia jeho dezintegráciou. Z rozrušeného mycélia sa enzým extrahuje vodou alebo tlmivým roztokom. Suspenzia mycélia sa môže dezintegrovať použitím napr. vysokotlakového dezintegrátora, vysokorýchlostného guľového mlyna, mixérového homogenizátora alebo kotúčového dezintegrátora. V literatúre sa uvádza uvoľňovanie glukózaoxidázy z buniek rastlinnými proteínázami [10] a ultrazvukom [11]. Zo získaného extraktu sa enzým zráža síranom amónnym [12], diaminoetoxyakridínlaktátom [13], acetónom a etanolom [14]. Opísanými spôsobmi sa z mycélia získa zmes enzýmov, ktorá sa vzhľadom na požadovanú čistotu preparátu glukózaoxidázy môže ďalej purifikovať. K najčastejšie používaným separačným technikám patrí ionexová chromatografia na DEAE-celulóze, DEAE-Spherone [14–16], iónová hydrofóbna chromatografia na Amberlite CG-50 [17] a gélová chromatografia na Sephadex G-150 a G-200 [4, 18].

Zistilo sa, že glukózaoxidáza z *Aspergillus niger* vykazuje katalytickú aktivitu v rozsahu pH 2–10. V literatúre uvádzané optimum pre oxidáciu glukózy je pH 5,5 [19]. Optimálna teplota pre katalytickú činnosť glukózaoxidázy je v rozmedzí 30–60 °C, rýchlosť reakcie sa nemení. Pri teplotách 50–60 °C však možno uvažovať o nezmenej rýchlosti iba v počiatočnej fáze reakcie. Po určitom čase dochádza k inaktivácii enzýmu. Teplota však nemení iba aktivitu enzýmu, ale ovplyvňuje katalýzu aj tým, že znižuje koncentráciu kyslíka ako jedného substrátu v médiu, pretože jeho rozpustnosť s rastúcou teplotou klesá.

Glukózaoxidáza špecificky oxiduje β -D-glukózu na glukónolaktón. Okrem β -D-glukózy môže katalyzovať aj oxidáciu iných sacharidov, resp. derivátov glukózy, napr. galaktózu, manózu, xylózu oxiduje na zodpovedajúce aldónové kyseliny [20]. Adams [21] študoval vplyv mutarotácie na oxidáciu glukózy a zistil, že mutarotácia je faktorom, ktorý môže limitovať túto oxidačnú reakciu, pretože množstvo zoxidovanej glukózy v systéme zodpovedalo vždy množstvu glukózy prítomnej v reakčnej zmesi v β -forme.

Táto práca sa zameriava na izoláciu a biochemickú charakterizáciu glukózaoxidázy z odpadového mycélia *Aspergillus niger* po glukónovej fermentácii. Problematika glukónovej fermentácie s cieľom získavania kys. glukónovej,

glukonátu sodného, glukonátu vápenatého a δ -glukonolaktónu sa rieši na Katedre biochemickej technológie CHTF SVŠT v Bratislave.

Materiál a metódy

Kultivácia *A. niger*. Kmeň *Aspergillus niger* CCM 8004 sa fermentoval v 7 l fermentore Electrolux s úžitkovým objemom 4,5 l v podmienkach submerznej kultivácie tak, ako to uvádza práca Rosenberga a kol. [22].

Dezintegrácia mycélia. Mycélium sa odfiltrovalo od fermentačného média na Büchnerovom lieviku, premylo sa vodou a táto suspenzia (sušina 5 %) sa dezintegrovala na korundovom kotúčovom dezintegrátore (2 cykly), na mixérovom dezintegrátore (10 min, 5000 ot./min) alebo na vysokotlakovom homogénizátore (1 cyklus). Pred mletím suchého mycélia na mlynčeku a v trecej miske sa mycélium vysušilo pri 45 °C. Rozbité mycélium sa odfiltrovalo na Büchnerovom lieviku a ďalej sa spracúval získaný filtrát.

Izolácia glukózaoxidázy. Zo získaného extraktu sa glukózaoxidáza zrážala 96 % etanolom. Zrazenina sa odstredila na centrifúge K 23 D (VEB MLW, Leipzig, NDR) pri 4000 ot./min počas 10 minút a bola rozsuspendovaná v destilovanej vode, ktorej objem bol desaťkrát menší ako pôvodný objem extraktu. Vzhľadom na to, že zmes obsahovala látky nerozpustné vo vode, pristúpilo sa k ďalšej centrifugácii počas 10 minút pri 12 000 ot./min. Až takto prečistený roztok sa použil na purifikáciu glukózaoxidázy.

Gélová chromatografia. Prvou odskúšanou purifikačnou metódou bola gélová chromatografia na Sephadex G-200. Gél napučieval 72 hodín pri teplote 25 °C v destilovanej vode a potom sa ním naplnila sklená kolóna (30 × 3 cm) do výšky 28 cm. Po nastavení kolóny na pH 6 fosfátovým tlmivým roztokom koncentrácie 0,015 mol · l⁻¹ sa na hlavu kolóny naniesla vzorka (10 ml). Kolóna sa premývala tým istým tlmivým roztokom pri prietoku 0,4 ml/min. V jednotlivých frakciách (5 cm³) sa stanovila aktivita glukózaoxidázy a katalázy a absorbancia pri 280 nm.

Ionexová chromatografia. DEAE-Spheron slúžiaci ako náplň kolóny pri ionexovej chromatografii sa pred použitím uviedol do OH⁻ cyklu roztokmi v tomto poradí: 2 mol · l⁻¹ roztok NaOH, destilovaná voda, 2 mol · l⁻¹ roztok HCl, destilovaná voda, 2 mol · l⁻¹ roztok NaOH, destilovaná voda. Takto pripraveným ionexom sa naplnila sklená kolóna (20 × 2 cm) do výšky 18 cm a nastavil sa prietok 0,8 ml/min. Na kolónu ekvilibrovanú na pH 7,5 0,01 mol · l⁻¹ fosfátovým tlmivým roztokom sa naniesla vzorka (7 ml) a kolóna sa premyla tým istým tlmivým roztokom. Potom sa vzorka eluovala lineárnym gradientom iónovej sily zloženia: 0,2 mol · l⁻¹ fosfátový tlmivý roztok pH 5,5 a 0,2 mol · l⁻¹ fosfátový tlmivý roztok pH 5,5 + 1 mol · l⁻¹ NaCl. Odobera-

li sa frakcie objemu 5 cm^3 a stanovovala sa v nich aktivita glukózaoxidázy, katalázy a absorbancia pri 280 nm .

Hydrofóbná iónová chromatografia. Sklená kolóna ($20 \times 2 \text{ cm}$) sa pri hydrofóbnej iónovej chromatografii naplnila Amberlitom CG-50 do výšky 18 cm a premývala sa $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátovým tlmivým roztokom pH $4,4$. Po ekvilibracii sa na hlavu kolóny naniesla vzorka, ktorej pH bolo upravené na hodnotu $4,4$. Kolóna sa premyla $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátovým tlmivým roztokom pH $4,4$ a vzorka sa eluovala lineárnym gradientom pH: $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátový tlmivý roztok pH $4,4$ a $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátový tlmivý roztok pH $5,5$. Chromatografia prebiehala pri objemovom prietoku $0,6 \text{ ml/min}$ a odoberali sa 5 ml frakcie, v ktorých sa stanovovala aktivita glukózaoxidázy, katalázy a absorbancia pri 280 nm .

Biochemická charakterizácia glukózaoxidázy. Biochemické charakteristiky izolovanej glukózaoxidázy z *Aspergillus niger* sa sledovali na modelovom laboratórnom miešanom reaktore objemu 50 ml . Ide o sklenú nádobku s dvojitým plášťom na teplotu a uzáverom, cez ktorý je do reaktora zavedená elektróda na meranie pH a pipeta na dávkovanie NaOH, ktorým sa neutralizovala vznikajúca kyselina glukónová. Reakčná zmes sa miešala pomocou magnetického miešadla a nad jej povrch sa privádza kyslík. Sledoval sa vplyv koncentrácie NaCl ($0\text{--}4,6 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a koncentrácie etanolu ($0\text{--}20 \%$).

Vplyv pH a teploty na rýchlosť oxidácie glukózy sme sledovali postupmi uvedenými v [20].

Na posúdenie substrátovej špecificity sa použila metóda, pri ktorej sa sledovala tvorba peroxidu vodíka počas oxidácie použitých sacharidov. Ďalší postup stanovenia sa uvádza pri stanovení aktivity glukózaoxidázy.

Stanovenie aktivity enzýmov. Na stanovenie aktivity glukózaoxidázy sa používa metóda, pri ktorej sa peroxid vodíka vznikajúci v reakcii prenáša účinkom peroxidázy na chromogén *o*-dianizidín, ktorý sa sfarbuje úmerne množstvu vytvoreného peroxidu. K $2,6 \text{ ml}$ chromogénu ($0,1 \text{ ml}$ 1% *o*-dianizidínu v metanole sa pridalo k 12 ml $0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátového tlmivého roztoku pH $6,0$) sa napipetovalo $0,05 \text{ ml}$ roztoku 18% glukózy. Pridaním $0,05 \text{ ml}$ príslušne zriedenej vzorky glukózaoxidázy sa začala reakcia. V 30-sekundových intervaloch sa odčítavala hodnota absorbancie pri 460 nm oproti slepému pokusu (namiesto enzýmu rovnaké množstvo destilovanej vody).

Na stanovenie aktivity katalázy sa používa metóda, pri ktorej sa sleduje úbytok peroxidu vodíka z roztoku po pridaní katalázy. Zmena koncentrácie peroxidu vodíka sa sleduje ako zmena absorbancie pri 240 nm . Substrát obsahujúci peroxid vodíka sa pripravil pridaním $0,3 \text{ ml}$ 30% peroxidu vodíka do 50 ml $0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátového tlmivého roztoku pH $7,0$. Z tohto zásobného roztoku sa na stanovenie pipetoval 1 ml . Pridaním 2 ml príslušne zriedenej vzorky katalázy sa začala reakcia. V 10-sekundových intervaloch (od 10 . do

70. sekundy) sa zaznamenávala absorbanca oproti slepému pokusu, ktorý obsahoval namiesto vzorky rovnaký objem destilovanej vody.

Na stanovenie koncentrácie proteínov pri zisťovaní špecifickej aktivity sa použila Lowryho metóda.

Výsledky a diskusia

Dezintegrácia mycélia. Pred izoláciou glukózaoxidázy z *Aspergillus niger* bolo potrebné mycélium dezintegrovat', pričom sa porovnávali štyri spôsoby dezintegrácie (tab. 1). Hanus a kol. [24] ako najvhodnejší spôsob dezintegrácie uvádzajú mletie vysušeného mycélia a jeho následné suspendovanie vo vode. Nevýhodou tohto spôsobu však je, že mycélium sa musí vysušiť, čím vznikajú straty enzýmovej aktivity a rastú náklady na energiu. Preto sa tento spôsob dezintegrácie porovnával so spôsobmi priamej dezintegrácie suspenzie mycélia, ktoré sa po fermentácii 2–3-krát premylo studenou vodou. Výsledky pokusu sú v tabuľke 1.

Z výsledkov vyplýva, že z hľadiska špecifických aktivít glukózaoxidázy v extraktoch vhodnejším spôsobom je dezintegrácia suspenzie mycélia na korundovom kotúčovom dezintegrátore a na vysokotlakovom homogenizátore, pretože sa získali takmer dvojnásobne vyššie výťažky enzýmu i špecifické aktivity glukózaoxidázy v porovnaní s mletím vysušeného mycélia. Vysokotlaková homogenizácia sa úspešne odskúšala aj v poloprevádzkovom meradle.

Izolácia glukózaoxidázy. Po získaní extraktu z mycélia *Aspergillus niger* treba skoncentrovať glukózaoxidázu a izolovať ju od znečisťujúcich proteínov a iných balastných zložiek obsiahnutých v mycéliu. V literatúre [14] sa opisuje spôsob izolácie glukózaoxidázy a katalázy z extraktu *Penicillium notatum* precipitáciou etanolom a acetónom, pričom z hľadiska výťažnosti i ďalšieho po-travínárskeho využitia enzýmu sa ako výhodnejšia ukázala precipitácia etanolom. Vzhľadom na svoju jednoduchosť sa táto metóda odskúšala aj na izoláciu glukózaoxidázy z extraktu mycélia *Aspergillus niger*. V našom prípade porovnávaním výťažku a zvýšenia špecifickej aktivity izolovanej glukózaoxidázy sa sledoval vplyv koncentrácie etanolu, teploty a pH na precipitáciu enzýmu etanolom.

Vplyv koncentrácie etanolu (tab. 2) sa skúšal v rozsahu objemových pomerov extraktu k 96 % etanolu 10 : 12 až 10 : 17. Z výsledkov vyplýva, že pri koncentrácii etanolu 56 % obj. (extrakt : etanol = 10 : 14) sa dosiahol najvyšší výťažok glukózaoxidázy (93,3 %) a ďalším zvyšovaním koncentrácie etanolu sa už výťažok nezvyšoval, ale vzrastala koncentrácia celkových proteínov, čo spôsobilo znižovanie špecifickej aktivity. Z toho vyplýva, že optimum precipitácie je pri 56 % etanolu.

Tabuľka 1. Porovnanie účinnosti dezintegrácie *Aspergillus niger* mletím suchého mycélia s dezintegráciou suspenzie mycélia mixérovým homogenizátorom, korundovým kotúčovým dezintegrátorom a vysokotlakovým homogenizátorom

Table 1. Disintegration effectivity for *Aspergillus niger* by milling dry mycelium compared to disintegration of mycelium suspension by mixer homogenizer, corundum disk disintegrator and high pressure homogenization

Spôsob dezintegrácie ¹	Aktivita glukózooxidázy ² [μkat . ml ⁻¹]	Obsah proteínov ³ [mg . ml ⁻¹]	Špecifická aktivita ⁴ [μkat . mg ⁻¹]
mletie suchého mycélia ⁵	438,3	3,94	122,5
mixérový homogenizátor ⁶	429,2	4,92	87,2
korundový kotúčový homogenizátor ⁷	764,86	3,04	251,5
vysokotlakový dezintegrátor ⁸	787,40	3,11	253,2

¹Type of disintegration; ²Glucose oxidase activity; ³Protein content; ⁴Specific activity; ⁵Dry mycelium milling; ⁶Mixer homogenizer; ⁷Corundum disk homogenizer; ⁸High pressure disintegrator.

Tabuľka 2. Vplyv koncentrácie etanolu na zrážanie glukózooxidázy z extraktu mycélia *Aspergillus niger* pri teplote 15 °C a pH 6

Table 2. Influence of ethanol concentration on glucose oxidase precipitation from *Aspergillus niger* mycelium extract at 15 °C and pH 6

Objemový pomer extrakt: etanol ¹	Aktivita glukózo-oxidázy ² [μkat . ml ⁻¹]	Obsah proteínov ³ [mg . ml ⁻¹]	Špecifická aktivita ⁴ [μkat . mg ⁻¹]	Purifikačný faktor ⁵	Výťažok ⁶ [%]
10 : 12	3,37	2,75	1,23	4,87	44,0
10 : 13	5,85	4,13	1,25	5,64	76,0
10 : 14	7,14	5,04	1,41	5,63	93,3
10 : 15	6,83	5,19	1,33	5,30	89,3
10 : 16	6,75	5,21	1,29	5,15	88,1
10 : 17	6,87	5,54	1,24	4,93	89,8

¹Volume ratio extract : ethanol; ²Glucose oxidase activity; ³Protein content; ⁴Specific activity; ⁵Purification factor; ⁶Yield.

Vplyv teploty na účinnosť zrážania glukózooxidázy etanolom sa testoval v rozmedzí teplôt 5–20 °C. Výsledky pokusov sú v tabuľke 3. Teplota vplýva na výťažok aj špecifickú aktivitu glukózooxidázy, pričom za najvýhodnejšiu

Tabuľka 3. Vplyv teploty na etanolové zrážanie glukózooxidázy z extraktu mycelia *Aspergillus niger* pri objemovom pomere extrakt : etanol (10 : 15) a pH 6

Table 3. Temperature effect on ethanol precipitation of glucose oxidase from *Aspergillus niger* mycelium extract at volume ratio extract : ethanol (10 : 15) and pH 6

Teplota ¹ [°C]	Aktivita glukózo- oxidázy ² [μkat · ml ⁻¹]	Obsah proteínov ³ [mg · ml ⁻¹]	Špecifická aktivita ⁴ [μkat · mg ⁻¹]	Purifikačný faktor ⁵	Výťažnosť ⁶ [%]
5	5,45	4,70	1,14	4,07	82,6
10	5,76	5,06	1,14	4,00	86,7
15	5,99	4,47	1,34	4,62	90,0
20	5,72	4,70	1,22	4,27	86,1

¹Temperature. For 2–6 see Table 2.

Tabuľka 4. Vplyv pH na zrážanie glukózooxidázy z extraktu mycelia *Aspergillus niger* pri objemovom pomere extrakt : etanol (10 : 14) a teplote 15 °C

Table 4. Influence of pH value on glucose oxidase precipitation from *Aspergillus niger* mycelium extract at volume ratio extract : ethanol (10 : 14) and temperature 15 °C

pH	Aktivita glukózo- oxidázy ² [μkat · ml ⁻¹]	Obsah proteínov ³ [mg · ml ⁻¹]	Špecifická aktivita ⁴ [μkat · mg ⁻¹]	Purifikačný faktor ⁵	Výťažnosť ⁶ [%]
3,5	0	–	–	0	0
4,2	0	–	–	0	0
5,0	4,88	4,74	1,03	4,09	72,8
5,9	6,25	4,91	1,27	5,05	93,4
7,0	5,96	4,74	1,26	4,99	89,1

For 2–6 see Table 2.

sme považovali 15 °C. S klesajúcou teplotu úmerne klesal aj výťažok glukózo-oxidázy, čo je v súlade s teoretickými predpokladmi, že pri vyšších teplotách dochádza k silnejšej desolvatácii hydrofilných skupín proteínov a proteíny o to ľahšie precipitujú. Pri teplote vyššej ako 20 °C dochádza pravdepodobne k čiastočnej denaturácii enzýmu.

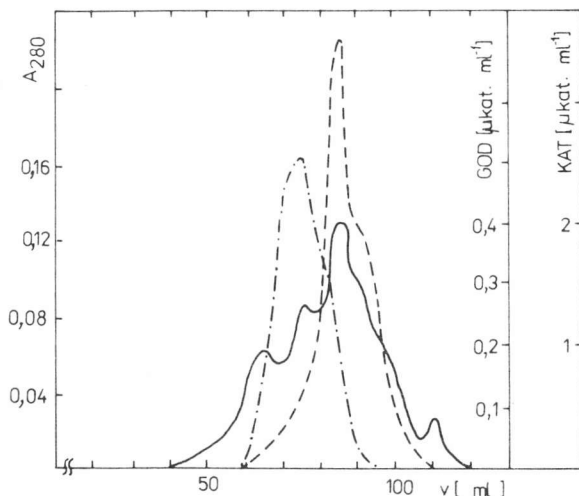
Vplyv pH na precipitáciu glukózooxidázy etanolom sa sledoval v rozmedzí 3,5–7,0. Pri výbere testovaných hodnôt pH sa vychádzalo z teoretického predpokladu, že etanolová precipitácia dosahuje najvyšší účinok pri hodnote pH blízkej izoelektrickému bodu, ktorý je pre glukózooxidázu pri pH 4,2, a zo skutočnosti, že pH neupraveného extraktu bolo 5,9. Z výsledkov uvedených v tabuľke 4 vidieť, že pH silne vplýva na etanolovú precipitáciu. Po jeho

úprave na hodnoty 3,5 a 4,2 nastala úplná denaturácia proteínu, najvyšší výťažok aj purifikačný faktor sa dosiahli v extrakte bez úpravy pH.

Z výsledkov vyplýva, že etanolová precipitácia je vhodná na izoláciu glukózooxidázy z extraktu mycélia *Aspergillus niger*. Za optimálnych podmienok (koncentrácia etanolu 56 % obj., teplota 15 °C a pH 6) sa získalo asi 93 % pôvodnej aktivity a špecifická aktivita sa zvýšila viac ako päťkrát.

Purifikácia glukózooxidázy. Preparát získaný etanolovou precipitáciou má pomerne nízku špecifickú aktivitu glukózooxidázy a obsahuje vysoké množstvo katalázy (desaťnásobne vyššia aktivita v porovnaní s glukózooxidázou). Na základe rozdielných molekulových vlastností glukózooxidázy a katalázy sme testovali tri spôsoby purifikácie: gélovú chromatografiu na Sephadex G-200, ionexovú chromatografiu na DEAE-Spheron a iónovú hydrofóbnú chromatografiu na Amberlite CG-50.

Gélová chromatografia využíva ako deliaci materiál pórovité gély, ktorými sa látky delia podľa veľkosti molekúl. Veľké molekuly nemôžu pre-

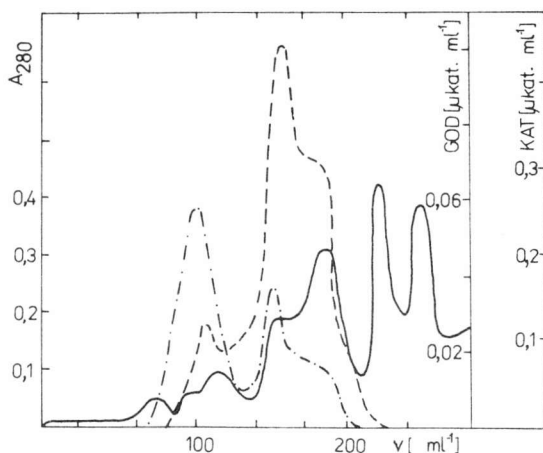


Obr. 1. Purifikácia glukózooxidázy z etanolového precipitátu myceliálneho extraktu *Aspergillus niger* gélovou chromatografiou. --- aktivita glukózooxidázy (GOD), -.-.- aktivita katalázy (KAT), — obsah proteínov (A_{280}). Podmienky separácie: použitý gél – Sephadex G-200, kolóna – sklená, 30 × 3 cm, naplnená ionexom do výšky 28 cm, kolóna premytá 0,015 mol · l⁻¹ fosfátovým tlmivým roztokom pH 6,6; objem vzorky 10 ml; elúcia – 0,015 mol · m⁻¹ fosfátovým tlmivým roztokom pH 6,0; objem frakcií 5 ml; prietok 0,4 ml · min⁻¹.

Fig. 1. Purification of glucose oxidase from ethanol precipitate of *Aspergillus niger* mycelial extract by gel chromatography. --- glucose oxidase activity (GOD), -.-.- catalase activity (KAT), — protein content (A_{280}). Separation conditions: gel – Sephadex G-200; column – glass, 30 × 3 cm, filled with ionex to 28 cm, column washed by 0.015 mol · l⁻¹ phosphate buffer solution pH 6.0; sample volume 10 ml; elution – 0.015 mol · l⁻¹ by phosphate buffer solution pH 6.0; volume of fractions 5 ml; flow 0.4 ml · min⁻¹.

nikat do vnútra častíc gélu a vychádzajú z kolóny skôr ako menšie molekuly, ktoré vnikajú do pórov a pohybujú sa pomalšie. Pretože molekulová hmotnosť glukózooxidázy je 160 000 a katalázy viac ako 300 000, kataláza eluuje z kolóny prvá. Priebeh gélovej chromatografie preparátu glukózooxidázy získaného etanolovou precipitáciou je na obrázku 1, z ktorého je zrejmé, že kataláza eluuje z kolóny ako prvá, ale jej časť (asi 20 %) vyteká z kolóny spolu s glukózooxidázou. Gélová filtrácia na Sephadexe G-200 je vhodná na oddelenie časti katalázy od glukózooxidázy, ale úplné oddelenie týchto enzýmov sa nedosiahlo. Aby sa kataláza úplne odstránila, bolo by vhodnejšie použiť gél, ktorý delí proteíny s vyššou molekulovou hmotnosťou. Nevýhodou gélu je jeho nízka kapacita a malá mechanická pevnosť.

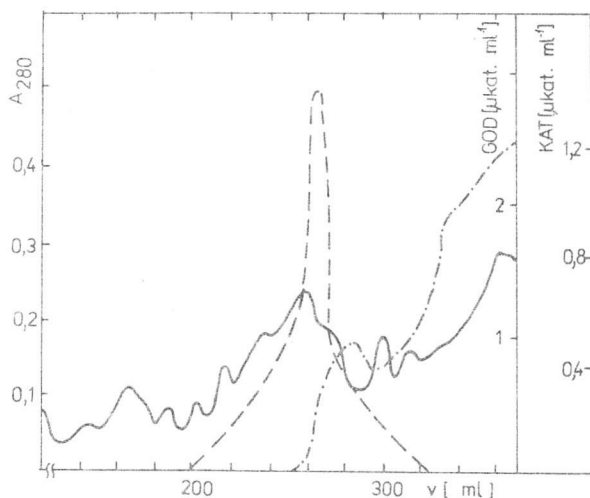
Ionexová chromatografia využíva na separáciu glukózooxidázy a katalázy rozdiel v hodnotách ich izoelektrických bodov. Izoelektrický bod (pI) glukózooxidázy je pri hodnote pH 4,2, katalázy pri hodnote pH 6,5. Obrázok 2 zná-



Obr. 2. Purifikácia glukózooxidázy z etanolového precipitátu myceliálneho extraktu *Aspergillus niger* ionexovou chromatografiou. --- aktivita glukózooxidázy (GOD), -.-.- aktivita katalázy (KAT), — obsah proteínov (A_{280}). Podmienky separácie: použitý ionex – DEAE-Spheron; kolóna – sklená, 20×2 cm, naplnená do výšky 18 cm; prietok $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; kolóna v OH^- cykle premytá $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátovým tlmivým roztokom pH 7,5; elúcia – $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátovým tlmivým roztokom pH 7,5, $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátovým tlmivým roztokom pH 5,5, $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátovým tlmivým roztokom pH 5,5 + $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl; objem vzorky 10 ml; objem frakcií 5 ml.

Fig. 2. Purification of glucose oxidase from ethanol preparative of *Aspergillus niger* mycelial extract by ionex chromatography. --- glucose oxidase activity (GOD), -.-.- catalase activity (KAT), — protein content (A_{280}). Separation conditions: ionex – DEAE-Spheron; column – glass 20×2 cm, filled to 18 cm; flow $0,8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$; column in OH^- cycle was washed by $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ by phosphate buffer solution pH 7.5, $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ by phosphate buffer solution pH 7.5, $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ by phosphate buffer solution pH 5.5, $0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ by phosphate buffer solution pH 5.5 + $1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl; sample volume 10 ml; volume of fractions 5 ml.

zorníuje priebeh ionexovej chromatografie na DEAE-Spheron. Nanesením preparátu glukózaoxidázy na kolónu DEAE-Spheronom ekvilibrovanú na pH 7,5 a jej premývaním 0,01 mol . l⁻¹ fosfátovým tlmivým roztokom pH 7,5 dosiahneme, že oba enzýmy sa na ionex naviažu. Premývaním kolóny 0,2 mol . l⁻¹ tlmivým roztokom pH 5,5 sa dosiahlo uvoľnenie asi 80 % katalázy pôvodne prítomnej vo vzorke, pretože zmenou náboja katalázy na kladný sa ruší jej väzba na anex. Glukózaoxidáza je naviazaná na anex, ale sila väzby sa vzhľadom na zmenu pH z hodnoty 7,5 na 5,5 znižuje a tým sa dá vysvetliť elúcia malého množstva glukózaoxidázy vo frakciách katalázy. Na elúciu glukózaoxidázy z anexu sa použil gradient iónovej sily. Ionexová chromatografia na DEAE-Spheron je vhodná na separáciu glukózaoxidázy a katalázy, použitý ionex má vyššiu kapacitu a vyššiu mechanickú pevnosť v porovnaní so Sephadexom G-200.



Obr. 3. Purifikácia glukózaoxidázy z etanolového precipitátu myceliálneho extraktu *Aspergillus niger* hydrofóbnou iónovou chromatografiou. --- aktivita glukózaoxidázy (GOD), -.-.-, aktivita katalázy (KAT), — obsah proteínov (A_{280}). Podmienky separácie: použitý gél - Amberlit CG-50; kolóna - sklená, 20 × 2 cm, naplnená do výšky 18 cm; prietok 0,6 ml . min⁻¹; kolóna premytá 0,2 mol . l⁻¹ acetátovým tlmivým roztokom pH 4,4; objem vzorky 20 ml; objem frakcií 5 ml; elúcia - lineárny gradient 0,2 mol . l⁻¹ acetátový tlmivý roztok pH 4,4 + 0,5 mol . l⁻¹ acetátový tlmivý roztok pH 5,5.

Fig. 3. Purification of glucose oxidase from ethanol preparative of *Aspergillus niger* mycelial extract by ionic hydrophobic chromatography. --- glucose oxidase activity (GOD), -.-.-, catalase activity (KAT), — protein content (A_{280}). Separation conditions: Gel - Amberlit CG-50; column glass, 20 × 2 cm, filled to 18 cm; flow 0.6 ml . min⁻¹; column was washed with 0.2 mol . l⁻¹ acetate buffer solution pH 4.4; sample volume 20 ml; volume of fractions 5 ml; elution - linear gradient 0.2 mol . l⁻¹ by acetate buffer solution pH 4.4 + 0.5 mol . l⁻¹ by acetate buffer solution pH 5.5.

Hydrofóbnou iónovou chromatografiou na Amberlite CG-50 sa separuje glukózaoxidáza od katalázy aj na základe rozdielných hodnôt izoelektrických bodov [17], ale v porovnaní s predchádzajúcou metódou interakcia ionex–enzým má iný charakter. Amberlit CG-50 má na hydrofóbnej matrici naviazané karboxylové skupiny a ekvilibračiou kolóny fosfátovým tlmivým roztokom na pH 4,4 sa kyslé skupiny protonizujú. Glukózaoxidáza má pri tejto hodnote pH veľmi nízky elektrický náboj a nadväzuje hydrofóbne interakcie s matricou živice. Zvyšovaním pH kyslé skupiny ionexu disociujú, zvyšuje sa záporný náboj molekuly glukózaoxidázy a dochádza k elektrostatickému odpudzovaniu záporných skupín živice a glukózaoxidázy, ktorá sa postupne uvoľňuje. Kataláza, ktorá sa viaže iónovou väzbou ($pI = 6,5$), ostáva naviazaná na ionexe a k jej elúcii dochádza až ďalším zvýšením pH roztoku. Priebeh separácie znázorňuje obrázok 3. Hydrofóbná iónová chromatografia na Amberlite CG-50 sa ukázala z hľadiska separácie glukózaoxidázy a katalázy z odskúšaných metodík ako najvhodnejšia.

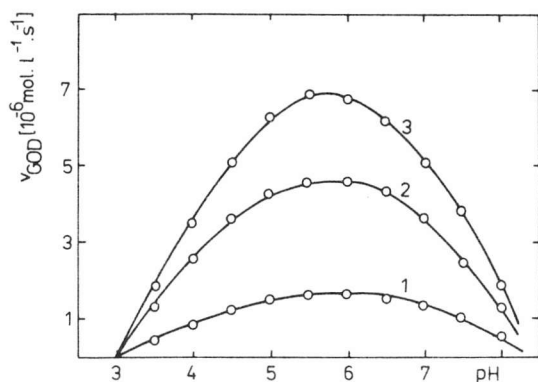
Biochemická charakterizácia. Pri purifikovanom enzýme sa ďalej zisťovali základné biochemické charakteristiky: substrátová špecifita, vplyv pH, teploty, etanolu a NaCl na rýchlosť oxidácie glukózy. Výber týchto parametrov bol podriadený plánovanému potravinárskemu a analytickému využitiu získaných preparátov. V experimentoch, v ktorých sa porovnávala rýchlosť oxidácie D-glukózy, D-manózy, D-galaktozy a D-xylózy sa zistilo, že všetky tieto sacharidy glukózaoxidáza oxidovala. Výsledky potvrdili literárne údaje [9], rýchlosť oxidácie manózy bola asi 1 % rýchlosti reakcie pre glukózu a v prípade D-galaktozy a D-xylózy bola rýchlosť ich oxidácie pod 1 % rýchlosti oxidácie D-glukózy.

Vplyv teploty na rýchlosť oxidácie glukózy glukózaoxidázou sa skúmal v rozmedzí 15–60 °C. Do 40 °C sa s rastúcou teplotou zvyšovala aj rýchlosť reakcie. Pri teplote 40 °C už dochádza k dvom konkurenčným javom: k zvyšovaniu rýchlosti vplyvom rastúcej teploty a k tepelnej inaktivácii enzýmu. Po istom čase sa inaktivácia enzýmu prejavuje postupným spomaľovaním reakcie, ktoré je tým zjavnejšie, čím je vyššia reakčná teplota. Celkove možno zhrnúť, že teplotné optimum pre katalytickú činnosť glukózaoxidázy, ktorú sme získali, je okolo 40 °C.

Vplyv pH na rýchlosť oxidácie glukózy sa skúmal v rozmedzí hodnôt 2–8. Výsledky sú na obrázku 4. Výrazné optimum glukózaoxidázy je pri pH 5,5–5,6, čo je v súlade s údajmi v literatúre [19].

Ďalej sa testoval účinok NaCl a etanolu na oxidáciu glukózy. Táto charakterizácia enzýmu je významná, pretože glukózaoxidáza sa používa v nápojovom priemysle na deoxygenáciu alkoholických nápojov a na ochranu tukov a rôznych údenárskych výrobkov, kde sa spomínané látky vyskytujú vo vyšších koncentráciách. Z výsledkov vyplynulo, že glukózaoxidáza sa môže

aplikovať aj do nápojov s pomerne vysokým obsahom alkoholu, pretože tento pri koncentrácii 20 % obj. znížil rýchlosť oxidácie glukózy na 50 % a pri obsahu alkoholu 10 % obj. klesla rýchlosť oxidácie na 75 % pôvodnej rýchlosti. Prídavkom chloridu sodného do reakčného média s výslednou koncentráciou 4,6 resp. 0,6 mol . l⁻¹ sa reakcia znížila o 70, resp. 35 %.



Obr. 4. Závislosť glukózooxidázovej reakcie od pH prostredia pri rôznych hladinách kyslíka. Experimentálne podmienky: McIlvaine tlmivé roztoky pH 2–8, koncentrácia kyslíka (v 10⁻³ mol . l⁻¹) : 0,1 (1), 0,4 (2), 0,6 (3).

Fig. 4. Dependence of glucose oxidase reaction on pH values of media at various oxygen levels. Experimental conditions: McIlvaine buffer solution pH 2–8, oxygen concentration (in 10⁻³ mol l⁻¹) : 0.1 (1), 0.4 (2), 0.6 (3).

Z uvedených nameraných biochemických charakteristík vyplýva, že získaný enzýmový preparát je výhodný na použitie v potravinárstve i analytike. Výsledky testovania tohto preparátu v potravinárstve uvádza ďalšia práca [25] a poznatky o analytickom využití glukózooxidázy z *Aspergillus niger* zhŕňajú Stredánský a kol. [26].

Literatúra

1. FROST, G. M. – MOSS, D. A.: Production of enzymes by fermentation. In: Biotechnology 7A, Enzyme Technology (Eds. H. J. Rehm, G. Reed). Verlag Chemie Weinheim 1987, s. 95.
2. PEPLER, H. J. – REED, G.: Enzymes in food and feed processing. In: Biotechnology 7A, Enzyme Technology (Eds. H. J. Rehm, G. Reed). Verlag Chemie Weinheim 1987, s. 547.
3. Van DIJKEN, J. P. – VEENHUIS, M., Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech., 9, 1980, s. 275.
4. TSUGE, H. – NATSUAKI, O. – OHASHI, K., J. Biochem. (Tokyo), 78, 1975, s. 835.
5. O'MALLEY, J. J. – WEAVER, J. L., Biochemistry, 11, 1972, s. 327.

6. PAZUR, J. H., J. Biol. Chem., 78, 1975, s. 835.
7. SWOBODA, B. E. P. – MASSEY, V., J. Biol. Chem., 240, 1965, s. 2209.
9. PAZUR, J. H. – KLEPPE, K., Biochemistry, 3, 1964, s. 578.
10. Pat. Jap. 7 595 476.
11. ISHIMORI, I. – NARUBE, I. – ISAO, K. – SUZUKI, S., Enzyme Microb. Technol., 4, 1984, s. 85.
12. Pat. ČSSR 103 453.
13. Pat. Ger 2 308 013.
14. RAKOVSKAJA, N. V., Ferm. Spirt. Prom., 32, 1966, s. 21.
15. MIKEŠ, O. – ŠTROUP, P. – SEDLÁČKOVÁ, J., J. Chromatogr., 148, 1978, s. 237.
16. SASIKI, I. – GOTOH, H. – LAMAMOTO, R. – TANAKA, H. – TAKAMI, K. – IAMASHITA, K. – HORIO, T., J. Biochem., 91, 1982, s. 1555.
17. MORVAI, R. M. – VAMOS, V. L., Elelmiszertudomány, 3, 1969, s. 17.
18. BROCHERT, A., J. Chromatogr., 244, 1982, s. 49.
19. TEH-LIANG CHEN, Biotechnol. Bioeng., 28, 1986, s. 107.
20. HLAING, T. T. – HUMMEL, J. P. – MONTGOMERY, R., Arch. Biochem. Biophys., 93, 1961, s. 321.
21. ADAMS, E. C. – MAST, R. L. – FREE, A. H., Arch. Biochem. Biophys., 92, 1960, s. 230.
22. ROSENBERG, M. – ŠTURDÍK, E. – ROSENBERGOVÁ, I. – STREĎANSKÝ, M., Bull. PV (in press).
23. DAWSON, R. M. C. – ELLIOTT, C. D. – ELLIOT, W. H. – JONES, K. M.: Data for Biochemical Research. Oxford, Clarendon Press 1986.
24. Pat. ČSSR 103 453.
25. STREĎANSKÝ, M. – CÍFERSKÁ, G. – ŠTURDÍK, E. – ROSENBERG, M. – KOVÁČ, J. KREMnický, L. – VAVREK, R., Bull. PV (v tlači).
26. STREĎANSKÝ, M. – ŠVORC, J. – ŠVORC, R. – CÍFERSKÁ, G. – ROSENBERG, M. – ŠTURDÍK, R., Bull. PV (v tlači).

Изоляция и биохимическая характеристика глюкозооксидазы из *Aspergillus niger* для пищевого и аналитического использования

Резюме

Работа решает проблемы изоляции глюкозооксидазы из мицелия *Aspergillus niger* после глюконовой ферментации. Самым подходящим методом для измельчения мицелия является гомогенизация под высоким давлением и дробление на дисковом корундовом дезинтеграторе. Для изоляции глюкозооксидазы из полученного экстракта авторы применили этаноловое осадкообразование при условиях 15 °C, pH 6 и 56 % объема этанола. В дальнейшем авторы сравнили три способа очистки толстого препарата. Самые хорошие результаты получили при использовании ионовой гидрофобной хроматографии на Amberlit CG-50.

У полученного препарата авторы характеризовали оптимальное pH, температуру, специфичность действия субстрата и чувствительность на влияние этанола и NaCl.

**Isolation and biochemical characterization of glucose oxidase from *Aspergillus niger*
for food and analytical utilization**

Summary

Isolation of glucose oxidase from the mycelium of *Aspergillus niger* after a gluconic acid fermentation was studied. Four methods of disruption of the mycelium were compared. High pressure homogenization and disruption in a corund disk disintegrator seemed suitable. Cellular extract was precipitated with ethanol. Optimized conditions for precipitation are 15 °C, pH 6, 56 vol. % of ethanol. Three methods of purification of the obtained precipitate were compared in the next. The best results were achieved with hydrophobic-ionic chromatography on Amberlite CG-50. The obtained substrate was characterised with respect to optimal pH value, temperature, substrate specificity, as well as sensitivity to ethanol and NaCl.