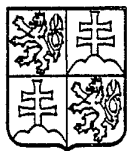


# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

# 277 474

ČESKÁ  
A SLOVENSKÁ  
FEDERATIVNÍ  
REPUBLIKA  
(19)



FEDERÁLNÍ  
ÚŘAD PRO  
VYNÁLEZY

- (21) Číslo přihlášky: **6718-89**  
(22) Přihlášeno: 29. 11. 89  
(40) Zveřejněno: 18. 11. 92  
(47) Uděleno: 28. 12. 92  
(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: 17. 02. 93

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 12 N 9/99**

- (73) Majitel patentu:  
Slovenská technická univerzita v Bratislave,  
Bratislava, CS;
- (72) Původce vynálezu:  
Rosenberg Michal ing. CSc., Brno, CS;  
Šturdík Ernest doc. ing. CSc., Bratislava,  
CS;

(54) Název vynálezu:  
**Způsob inaktivace katalázy**

- (57) Anotace:  
Způsob ireverzibilní inaktivace katalázy v buňkách *Aspergillus niger* a v technických glukózaoxidázových preparátech se provádí tak, že se mycelium *Aspergillus niger* nebo technický preparát glukózaoxidázy uvede do styku s 0,1 až 5 % hmot. metanalem a 0,5 až 5 % hmot. peroxidem vodíku při 4 až 15 °C a po 5 až 30 minutách se glukózaoxidáza izoluje a purifikuje známými postupy. Tímto způsobem je možné jednoduchým způsobem připravit preparáty glukózaoxidázy bez katalázové aktivity, výsledný preparát neobsahuje složky inaktivační směsi.

CS 277 474 B6

Vynález se týká způsobu inaktivace katalázy v buňkách vláknitých hub i v jejich bezbuňkových extraktech.

Enzym glukózaoxidáza má široké použití v klinické diagnostice, desacharizaci potravinářských výrobků, stabilizaci nápojů i v dalších odvětvích. I když je glukózaoxidáza produkovaná různými mikroorganismy, v průmyslovém měřítku se používají jako zdroj tohoto enzymu vláknité houby *Aspergillus niger* a *Penicillium species*. V takto získaných enzymových preparátech je však glukózaoxidáza doprovázená enzymem katalázou, který je při mnohých aplikacích glukózaoxidázy nevýhodný, protože působí rušivě na specifickou reakci, kterou tento enzym katalyzuje (Bergmeyer, V. H.: In *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 2, Verlag, Weinheim, 1983). Tak tomu je například při přípravě testů, respektive indikátorových papírků na stanovení cukrů, především glukózy v médiích a v tělních tekutinách.

K separaci glukózaoxidázy od katalázy se nejčastěji používá ionová chromatografie se slabým anexem (Pat. ČSSR 103 453, Sasaki et al.: *J. Biochem.* 91, 1555 (1982), Mikeš, O. et al.: *J. of Chromatog.* 148, 237 (1978)), ionová hydrofóbní chromatografie na Amberlitě CG-50, gélová filtrace na Sefadexu G-150 a 200 (Brochert, A.: *J. of Chromatog.* 244, 49, (1982)), afinitní chromatografie na imunosorbentu (Clark, L. C.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102, 29 (1962)) a další metody.

Nevýhodou těchto metod z hlediska průmyslového použití je vysoká cena a dostupnost chromatografických náplní, kapacita kolon, časová náročnost a často i nutnost zařazení nových technologických operací (například odsolení). Při přípravě technického preparátu glukózaoxidázy běžné metody separace enzymu, jako je srážení síranem amonným (Pat. ČSSR 103 453, 143 103), diaminoetoxyakridinlaktátem (Pat. NSR 2 308 013) neumožňuje přípravu glukózaoxidázového preparátu bez katalázové aktivity. Také přídavek inhibitorů katalázy (těžké kovy, azidy, soli hydroxylaminu, 2,4-dichlorfenol, tiazolové deriváty a další) není při mnohých aplikacích glukózaoxidázy žádoucí a navíc je účinek mnohých inhibitorů reverzibilní (Webb J. L.: In *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Academic Press, New York, (1966)).

Inaktivace katalázy způsobem podle vynálezu je velmi výhodná, protože je možné jednoduchým způsobem vysoce selektivně ireverzibilně inaktivovat enzym katalázu v glukózaoxidázových preparátech, získaných z buněk vláknitých hub. Navíc je možné katalázu inaktivovat přímo v buňkách vláknitých hub a glukózaoxidázu potom izolovat z buněk běžnými separačními postupy, což zjednodušuje podstatně celý izolační proces. Enzymové preparáty, získané způsobem podle vynálezu, neobsahují reziduální látky z inaktivační směsi, protože peroxid vodíku je rozkládán v průběhu inaktivace působením enzymu katalázy a zbytkový formaldehyd se odseparuje od enzymu glukózaoxidázy v procesu izolace enzymu (ultrafiltrace, precipitace).

Způsob inaktivace katalázy podle vynálezu spočívá v tom, že se buněčná hmota vláknité houby *Aspergillus niger* nebo z ní izolovaný hrubý enzymový preparát glukózaoxidázy uvede do styku s roztokem obsahujícím 0,1 až 5 % metanal a 0,5 až 5 % peroxid

vodíku a směs se míchá při 4 až 20 °C po dobu 5 až 20 minut. Po inaktivaci katalázy se glukózaoxidáza izoluje z buněk *Aspergillus niger* a dále purifikuje běžnými postupy.

Výhodou navrhovaného způsobu inaktivace katalázy v přítomnosti glukózaoxidázy v buňkách vláknitých hub a v technických preparátech glukózaoxidázy v porovnání s doposud používanými postupy je, že předmětný způsob je ekonomicky nenáročný s jednoduchými technologickými operacemi, inaktivace katalázy je ireverzibilní a výsledný preparát neobsahuje složky inaktivační směsi. Navíc je možné inaktivovat selektivně katalázu přímo v buňkách vláknitých hub, což podstatně zjednodušuje přípravu technických preparátů glukózaoxidázy.

Vynález ilustrují následující příklady provedení, kterými se však rozsah vynálezu v žádném směru neomezuje.

#### Příklad 1

Do 500 ml vodní suspenze mycelia *Aspergillus niger* CCM 8004 (sušina 15 g/dm<sup>3</sup>) s aktivitou glukózaoxidázy 40.10<sup>3</sup>U/g (suchá váha) a katalázy 2,5.10<sup>6</sup> U/g (suchá váha) (definice U - viz Wortington Enzyme Manual, Wortington Biochemical Corp. Freehold, New Jersey, 1972) bylo přilito 500 ml vodního roztoku obsahujícího metanal (1 % hmot.) a peroxid vodíku (1 % hmot.). Směs se míchala při 6 °C po dobu 10 min a potom se mycelium oddělilo od tekutého podílu filtrací. Mycelium obsahovalo 94 % glukózaoxidázové a 2 % katalázové aktivity, původně obsažené v myceliu.

#### Příklad 2

Do 50 ml vodního roztoku technické glukózaoxidázy (aktivita glukózaoxidázy 130 U/cm<sup>3</sup>, katalázy 7 500 U/cm<sup>3</sup>) bylo přilito 50 ml vodního roztoku obsahujícího 1 % (hmot.) metanalu a 2 % (hmot.) peroxidu vodíku. Směs se míchala při 4 °C po dobu 5 minut. Enzymy byly v daném čase precipitované ledovým etanolem (poměr voda : etanol = 9 : 5) a oddělené centrifugací. Po resuspendování sedimentu obsahoval preparát 90 % původní glukózaoxidázové a 1 % katalázové aktivity.

### P A T E N T O V É N Á R O K Y

Způsob inaktivace katalázy vedle glukózaoxidázy, vyznačující se tím, že se buňky vláknité houby *Aspergillus niger* nebo vodné technické glukózaoxidázové preparáty připravené z mycelia vláknité houby *Aspergillus niger* uvedou do styku s vodným roztokem, obsahujícím metanal v koncentraci 0,1 až 5 % hmot. a peroxid vodíku v koncentraci 0,5 až 5 % hmot. a směs se míchá při 4 až 15 °C po dobu 5 až 30 minut.

---

Konec dokumentu

---