(19) DANMARK

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 151266 B

PATENTDIREKTORATET
KØBENHAVN

(21) Patentansøgning nr.: 1684/78

(22) Indleveringsdag: 18 apr 1978

(41) Alm. tilgængelig: 20 okt 1978

(44) Fremlagt: 16 nov 1987

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 19 apr 1977 JP 44146/77

(51) Int.Cl.[4] C 12 N 9/04
C 12 Q 1/32

(71) Ansøger: *KYOWA HAKKO KOGYO CO. LTD.; 6-1; Ohtemachi Itchome; Chiyoda-ku; Tokyo, JP

(72) Opfinder: Osamu *Terada; JP, Takayuki *Uwajima; JP, Akira *Mihara; JP, Kazuo *Aisaka; JP, Hiroko *Akita; JP, Toshiaki *Nagai; JP, Yoshiaki *Shimizu; JP

(74) Fuldmægtig: Patentbureauet Hofman-Bang & Boutard A/S

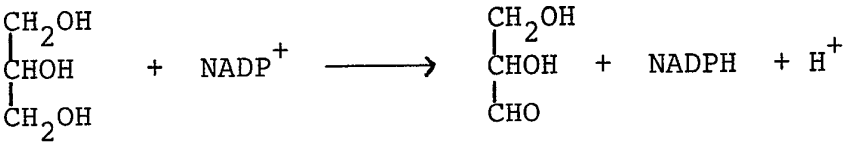
(54) Glyceroloxidase og fremgangsmåde til fremstilling deraf samt fremgangsmåde til kvantitativ bestemmelse af glycerol

(56) Fremdragne publikationer

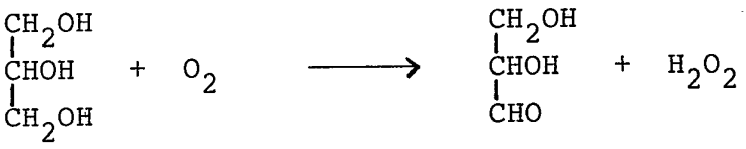
Andre publikationer : Chemical Abstracts 76, 96153

Opfindelsen angår et glyceroloxiderende enzym, der i det følgende vil blive betegnet som "glyceroloxidase", en fremgangsmåde til fremstilling deraf og en fremgangsmåde til kvantitativ bestemmelse af glycerol i opløsning ved anvendelse af glyceroloxidasen.

Der kendes enzymer, der oxiderer glycerol, f.eks. glyceroldehydrogenase, jvf. Chem. Abstr. 76 (1972), 96153v, som katalyserer følgende reaktion:



Det har nu vist sig, at visse bestemte stammer tilhørende slægterne Aspergillus og Neurospora ved dyrkning i nærvær af glycerol danner en gruppe hidtil ukendte enzymer, her under et betegnet glyceroloxidase, som katalyserer følgende reaktion:



I overensstemmelse hermed er glyceroloxidasen ifølge opfindelsen ejendommelig ved, at den er identisk med det glyceroloxiderende enzym, der dannes ved dyrkning af en af de i krav 1's kendetegnende del angivne mikroorganismer i nærvær af glycerol, og fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af glyceroloxidasen er ejendommelig ved, at en mikroorganisme tilhørende slægten Aspergillus eller slægten Neurospora dyrkes i et næringsmedium indeholdende glycerol i en mængde på 0,1-5 g/dl, og at enzymet udvindes fra den resulterende dyrkningsblanding.

Glyceroloxidasen er hensigtsmæssig til kvantitativ bestemmelse af glycerol, og fremgangsmåden ifølge opfindelsen til kvantitativ bestemmelse af glycerol i opløsning er ejendommelig ved, at glycerolet omsættes med oxygen i nærvær af glyceroloxidasen ifølge krav 1, og at den forbrugte mængde oxygen eller den dannede mængde hydrogenperoxid eller glyceraldehyd måles.

Det hidtil ukendte enzym ifølge opfindelsen har de følgende enzymologiske og fysisk-kemiske egenskaber:

(1) Virkning:

Glyceroloxidasen oxiderer glycerol under forbrug af oxygen til dannelse af hydrogenperoxid og glyceraldehyd.

(2) Substratspecificitet:

Enzymet reagerer meget specifikt med glycerol.

(3) Optimalt pH og stabilt pH-område:

(3.1) Optimalt pH:

Glyceroloxidase produceret af mikroorganismerne af slægten Aspergillus (som i det følgende vil blive betegnet som "enzym fra Aspergillus")	pH 7-8
Glyceroloxidase produceret af mikroorganismerne af slægten Neurospora (som i det følgende vil blive betegnet som "enzym fra Neurospora")	pH 8,0-8

(3.2) Stabilt pH-område:

Enzym fra Aspergillus	pH 5,0-8
Enzym fra Neurospora	pH 5,0 -8

(4) Fremgangsmåde til bestemmelse af den enzymatiske aktivitet:

Enzymaktiviteten udtrykkes ved "enhed". En "enhed" for enzymaktivitet defineres som den mængde enzym, som vil nedbryde 1 µmol glycerol ved 37°C på 1 minut i nærvær af oxygen. Bestemmelsen af enzymaktiviteten udføres som følger: Glycerol omsættes med glyceroloxidase under omrøring til dannelse af hydrogenperoxid, og 4-aminoantipyrin og phenol omsættes med det resulterende hydrogenperoxid i nærvær af peroxidase til opnåelse af quinonimin-pigment. Det resulterende quinonimin-pigments optiske tæthed ved 500 nm måles til bestemmelse af den dannede mængde hydrogenperoxid, hvorved enzymaktiviteten bestemmes (dette vil i det følgende blive betegnet som "4-AA-metoden").

Med denne beskrivelse defineres specifik aktivitet ved "enhed pr. mg protein". Mængden af enzymprotein måles ifølge Lowry's metode under anvendelse af kobber-Folin-reagens. [O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L Farr og R.J. Randall: J. Biol. Chem., 265 (1951)].

(5) Optimale temperaturområde for virkning:

Enzym fra Aspergillus	omkring 40°C.
Enzym fra Neurospora	40 - 45°C.

(6) Betingelser for inaktivering p.g.a. pH, temperatur osv.:

(6.1) Betingelse for inaktivering p.g.a. temperatur:

Enzymet fra Aspergillus inaktiveres omkring 60% efter behandling ved 45°C i 30 minutter og i det væsentlige fuldstændigt efter behandling ved 60°C i 30 minutter.

Enzymet fra Neurospora inaktiveres omkring 50% efter behandling ved 25°C i 30 minutter og i det væsentlige fuldstændigt efter behandling ved 50°C i 30 minutter.

(6.2) Betingelse for inaktivering p.g.a. pH:

Enzymet fra Aspergillus inaktiveres ved en pH-værdi på over 10 eller under 4 i løbet af 30 minutter.

Enzymet fra Neurospora inaktiveres under samme pH-betingelser som anført ovenfor.

(7) Inhibering, aktivering og stabilisering:

(7.1) Inhibitor:

Enzymaktiviteter opnået ved tilsætning af 1 mM af forskellige inhibitorer er vist i tabel 1, idet enzymets aktivitet uden tilsætning af inhibitoren defineres som 100. Aktiviteterne måles ifølge 4-AA-metoden, hvorved der afledes et pigment af 4-aminoantipyrin-systemet fra det dannede H_2O_2.

TABEL 1

Inhibitor \ Enzym	Enzym fra Aspergillus	Enzym fra Neurospora
Ingen	100	100
$AgNO_3$	30	-
$HgCl_2$	20	23
$Pb(CH_3COO)_2$	15	-
$CuSO_4$	10	20
$ZnSO_4$	-	23
$FeSO_4$	-	0
NaN_3	20	-
o-phenanthrolin	90	-
α,α'-dipyridyl	85	-
PCMB (p-chlormercuribenzoat)	50	108
N-ethylmaleimid	100	-
NH_2OH-HCl	0	0
8-hydroxyquinolin	90	-
diethyldithiocarbamat	35	20
neocuproin	100	-
iodacetat	-	100
cystein	-	60
dithiothreitol	100	-
EDTA	105	80

(7.2) Aktivering:

Ingen forbindelse er endnu blevet fundet, som egner sig specielt til aktivering.

(7.3) Stabilisering:

Enzymet fra Aspergillus kan stabiliseres ved tilsætning af 0,1 - 1,0 mM af en sulfhydryl-forbindelse, såsom mercaptoethanol, dithio-threitol osv.

(8) Rensningsmetode:

Rensning kan gennemføres ved de efterfølgende konventionelle procedurer: (1) fraktioneret udfældning med ammoniumsulfat, (2) søjlechro-matografi på DEAE-cellulose, (3) sigtefraktio-nering med "Sephadex", (4) søjlechromatografi på hydroxyapatit, (5) frysetørring af aktive fraktioner osv., som det vil blive beskrevet nærmere i det følgende.

(9) Molekylvægt:

Molekylvægten af enzymet ifølge opfindelsen be-stemmes ifølge elueringsmønsteret ved analyse under anvendelse af en "Sephadex G-200"-søjle. Som resultat heraf bestemmes enzymet fra Asper-gillus at have en molekylvægt på 300 000 eller mere.

(10) Krystalstruktur og elementanalyse:

Ingen krystallisation er endnu lykkedes, og ingen bestemmelse er endnu blevet foretaget.

De omhandlede mikroorganismers mikrobiologiske egenskaber er anført i litteraturen som følger:

Aspergillus japonicus:	The genus Aspergillus: The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1965, side 327-328
Aspergillus oryzae:	ibid, side 370-373
Aspergillus parasiticus:	ibid, side 369-371
Aspergillus flavus:	ibid, side 361-365
Neurospora crassa:	Comparative Morphology of Fungi, McGraw-Hill Book Company, Inc., New York and London 1928, side 227; Jour. Agr. Res., 34, side 1019-1042 (1927)
Neurospora sitophila:	ibid, side 226-227
Neurospora tetrasperma:	ibid, side 227

Ethvert syntetisk og naturligt næringsmedium kan anvendes som medium ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, blot det på passende måde indeholder en carbonkilde, nitrogenkilde, uorganiske materialer og andre næringsstoffer, herunder glycerol i en mængde på 0,1-5 g/dl.

Som carbonkilde kan anvendes carbonhydrater, såsom glucose, melasse, osv., og sukkeralkoholer, såsom glycerol, sorbitol, mannitol osv.

Som nitrogenkilde kan anvendes ammoniak, forskellige uorganiske og organiske ammoniumforbindelser, såsom ammoniumchlorid, ammoniumsulfat, ammoniumcarbonat, ammoniumphosphat og ammoniumacetat, nitrogenforbindelser, såsom urinstof, nitrogenholdige organiske materialer, såsom pepton, gærextrakt, caseinhydrolysat, affedtede sojabønner og nedbrydningsprodukter deraf.

Som uorganiske materialer kan anvendes salte af sådanne metaller som natrium, kalium, mangan, magnesium, calcium, cobalt, nikkel, chrom, zink og kobber med sådanne syrer som f.eks. svovlsyre, phosphorsyre, salpetersyre og saltsyre.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen dyrkes den glyceroloxidase-producerende mikroorganisme i et medium indeholdende glycerol for at opnå et tilfredsstillende udbytte af glyceroloxidase. F.eks. er produktiviteten af glyceroloxidase målt som den aktivitet, der opnås, når mikroorganismen dyrkes i et medium indeholdende 3 g/dl glycerol, 10-100 gange så høj som den, der opnås når mikroorganismen dyrkes i et medium indeholdende 1 g/dl glucose, 1 g/dl maltextrakt og 0,5 g/dl gærextrakt eller Czapek-medium.

Dyrkningen gennemføres sædvanligvis ved en temperatur på 20-40°C, fortrinsvis 25-35°C, og ved en pH-værdi på 6-8 ved dyrkningens start, fortrinsvis ved pH omkring 7. Der dannes en betydelig mængde glyceroloxidase i den resulterende dyrkningsvæske ved rystekultur eller omrørt og luftet submers kultur under de nævnte betingelser i 30-72 timer.

Den således dannede glyceroloxidase kan udvindes fra den resulterende dyrkningsvæske på følgende måde:

Eftersom glyceroloxidase sædvanligvis dannes i mikroorganismecellerne, er proceduren til udvinding af enzymet fra cellerne beskrevet nedenfor. Mikroorganismeceller opnået ved filtrering eller centrifugering af dyrkningsvæsken efter dyrkningens udførelse, vaskes tilstrækkeligt med vand eller pufferopløsning. Derpå suspenderes cellerne i en passende mængde af en pufferopløsning og brydes. Brydningen gennemføres ved mekanisk nedbrydning (f.eks. ved hjælp af en morter, en "Dyno-mill" [produceret af Willy A. Bachofen, Schweiz], Manton goulin, fransk presse, Fuse presse, ultralyd-desintegrator osv.).

Faste materialer fjernes fra den resulterende opløsning af nedbrudte mikroorganismeceller ved filtrering eller centrifugering, og derpå udvindes glyceroloxidasen fra opløsningen ved den konventionelle procedure til isolering af enzymer. F.eks. kan enzympulvere opnås ved følgende trin: (1) fraktioneret udfældning med ammoniumsulfat, (2) søjlechromatografi på DEAE-cellulose, (3) sigtefraktionering med "Sephadex", (4) søjlechromatografi på hydroxyapatit og (5) frysetørring af aktive fraktioner. Selvfølgelig kan der om nødvendigt anvendes gentagelse af de samme arbejdstrin og kombination med andre konventionelle rensningsmetoder.

Opfindelsen skal i det følgende belyses nærmere under henvisning til tegningen, på hvilken

fig. 1 viser oxygenoptagelsen i et reaktionssystem, hvor glyceroloxidase omsættes med glycerol i nærvær af oxygen. I denne figur repræsenterer kurve A den optagne mængde oxygen i et reaktionssystem frit for katalase, og kurve B viser den optagne mængde oxygen i nærvær af katalase,

fig. 2 viser relative aktiviteter af enzymet fra Aspergillus efter inkubation ved 37°C og forskellige pH-værdier i 10 minutter,

fig. 3 viser restaktiviteter af enzymet fra Aspergillus efter behandling ved 30°C og forskellige pH-værdier i 30 minutter,

fig. 4 viser relative aktiviteter af enzymet fra Neurospora efter inkubation ved 37°C og forskellige pH-værdier i 10 minutter,

fig. 5 viser restaktiviteter af enzymet fra Neurospora efter behandling ved 30°C og forskellige pH-værdier i 30 minutter,

fig. 6 viser relationen mellem reaktionstid og optisk tæthed (ved 500 nm) ved måling af enzymets aktivitet,

fig. 7 viser enzymaktiviteterne af enzymet fra Aspergillus efter inkubation ved pH 8 og forskellige temperaturer i 10 minutter,

fig. 8 viser enzymaktiviteterne af enzymet fra Neurospora efter inkubation ved pH 8 og forskellige temperaturer i 10 minutter.

fig. 9 viser restaktiviteter af enzymet fra Aspergillus efter behandling ved pH 7 og forskellige temperaturer i 0,1 M ammoniumpufferopløsning i 30 minutter,

fig. 10 viser restaktiviteter af enzymet fra Neurospora efter behandling ved pH 7 og forskellige temperaturer i 0,1 M ammoniumpufferopløsning i 30 minutter, og

fig. 11 viser relationen mellem substratkoncentration (glycerol) og optisk tæthed af reaktionsopløsninger ved 500 nm i tabel 4.

Under anvendelse af respektive rensede præparater fremstillet i eksempel 1 og 2 udføres følgende forsøg:

I. Virkning

(a) Bekræftelse af dannelsen af hydrogenperoxid:

(a)-1. Glyceroloxidase omsættes med glycerol i nærvær af oxygen, og derpå sættes peroxidase, phenol og 4-aminoantipyrin til enzymsystemet, hvorved der dannes quinonimin-pigment i systemet [omsætning af hydrogenperoxid med peroxidase, phenol og 4-aminoantipyrin er angivet i Clin. Chem. 20, side 470 (1974)].

(a)-2. Glyceroloxidase omsættes med glycerol i nærvær af oxygen til dannelse af hydrogenperoxid, og der tilsættes katalase til nedbrydning af det dannede hydrogenperoxid. Derpå sættes peroxidase, phenol og 4-aminoantipyrin til reaktionssystemet til gennemførelse af den samme reaktion som ovenfor, men der dan-

nes intet quinonimin-pigment i reaktionssystemet.

(a)-3. Når katalase indføres i glyceroloxidationssystemet katalyseret af glyceroloxidase i nærvær af oxygen, nedsættes den optagne mængde oxygen til det halve. Dette understøttes af de følgende forsøgsresultater:

(a)-3-1. Reaktion A (system frit for katalase):

Reagenser

Vandig 0,01 M glycerolopløsning	0,5 ml
0,1 M NH_4OH-NH_4Cl pufferopløsning (i det følgende betegnet som "ammonium-pufferopløsning") (pH 8,0)	1,0 ml
Vandig glyceroloxidase-opløsning	0,2 ml *1
Vandig 2,4 mM 4-aminoantipyrin-opløsning	0,5 ml
Vandig 42 mM phenolopløsning	0,5 ml
Vandig peroxidase-opløsning	0,2 ml *2
Vand	0,1 ml

*1: 5 µ mol glyceroloxidase med en specifik aktivitet på 30 fremstillet i eks. 1.

*2: Fremstillet af Sigma Corp. (U.S.A.) og indeholdende 200 enheder med en specifik aktivitet på 1 000.

(a)-3-2. Reaktion B (system indeholdende katalase):

Reagenser

Vandig 0,1 M glycerolopløsning	0,5 ml
0,1 M ammonium-pufferopløsning (pH 8,0)	1,0 ml
Vandig glyceroloxidase-opløsning	0,2 ml *1
Vandig katalaseopløsning	1,0 ml *3
Vand	0,3 ml

*1: Samme som i reaktion A

*3: Fremstillet af Sigma Corp. (U.S.A.), og indeholdende 100 enheder katalase med en specifik aktivitet på 100.

(a)-3-3. Reaktionens gennemførelse:

Med systemet frit for katalase blandes reagenserne i reaktion A, og reaktionen gennemføres ved 37°C under omrøring. Den optagne mængde oxygen måles med et Warburg's manometer. Resultaterne er anført i fig. 1.

Med systemet indeholdende katalase blandes reagenserne i reaktion B, og reaktionen gennemføres ved 37°C. På samme måde måles den optagne mængde oxygen, som er anført i fig. 1.

Som det fremgår af fig. 1 forbruges 4,95 µM oxygen i fravær af katalase (kurve A i fig. 1) pr. 5,0 µM glycerol som substrat.

I nærvær af katalase (kurve B i fig. 1) forbruges 2,49 µM oxygen, hvilket er omkring halvdelen af mængden i (A).

Det bekræftes af de ovenstående reaktionssystemer (a)-1, (a)-2 og (a)-3, at enzymet ifølge opfindelsen kan danne hydrogenperoxid.

Kvantitativ bestemmelse af det dannede hydrogenperoxid foretages ved kolorimetrisk kvantitativ bestemmelse af det dannede quinonimid-pigment. Det bekræftes ved den kvantitative bestemmelse af det dannede hydrogenperoxid i systemet ved reaktion A ifølge 4-AA-metoden, at der dannes 4,92 µM hydrogenperoxid ud fra 5 µM glycerol.

(b) Bekræftelse af dannelsen af glyceraldehyd:

(b)-1. Glyceroloxidase omsættes med glycerol i nærvær af oxygen, og reaktionsproduktet identificeres som glyceraldehyd.

(b)-1-1. Identifikationsprocedure:

(b)-1-1-(1)- Reaktionsopløsning:

Der dannes en opløsning bestående af fem dråber af en vandig opløsning indeholdende 50 mg/ml glycerol, fem dråber af en opløsning indeholdende 10 enh./ml glyceroloxidase i 0,02 M tris-HCl-pufferopløsning og en dråbe opløsning indeholdende 14 000 enh./ml kata-

lase, og reaktionen gennemføres ved 30°C under rystning i 20 timer.

(b)-1-1-(2). Identifikation:

Som resultat af den nedenfor angivne tyndtlagschromatografi (i det følgende betegnet som "TLC") identificeres produktet i reaktionsopløsningen som glyceraldehyd ved sammenligning med det autentiske stof.

Den anvendte tyndtlagsplade er silicagel G-60F-254 (handelsnavn for E. Merck, Vesttyskland) og som udviklingsopløsningsmidler anvendes opløsningsmiddelsystem 1 [butanol/eddikesyre/vand i volumenforholdet 4:1:1] og opløsningsmiddelsystem 2 [butanol/-pyridin/vand i volumenforholdet 3:2:1,5].

Efter udviklingen gennemføres tre slags reaktioner på pladen, nemlig p-anisidin-saltsyre-reaktion, periodsyre-benzidin-reaktion og 2,4-dinitrophenylhydrazin-reaktion, og det bekræftes, at reaktionsprodukternes Rf-værdier og farvetonerne af pletter dannet ved de nævnte reaktioner er identiske med de tilsvarende for det autentiske stof. Resultaterne er anført i tabel 2.

Tabel 2

Identifikation af reaktionsprodukter ved TLC
(Rf-værdier af farvereaktioner)

Farvemiddel \ Udviklingsmiddel / Prøve		Opløsningsmiddelsystem 1		Opløsningsmiddelsystem 2
p-anisidin-saltsyre-reagens 1)	Glyceraldehyd (autentisk stof)	Rf-værdi	0,67 (brun)	0,67 (brun)
	Reaktionsprodukt	Rf-værdi	0,67 (brun)	0,77 (brun)
Periodsyre-benzidin-reagens 2)	Glyceraldehyd (autentisk stof)	Rf-værdi	0,66 (+)*	0,76 (+)*
	Reaktionsprodukt	Rf-værdi	0,67 (+)*	0,77 (+)*
2,4-dinitro-phenylhydrazin-reagens 3)	Glyceraldehyd (autentisk stof)	Rf-værdi	0,68 (orange)	0,77 (orange)
	Reaktionsprodukt	Rf-værdi	0,68 (orange)	0,77 (orange)

Den i parentes angivne farve viser plettens farvetone, og (+)* under periodsyre-benzidin-reagenset betyder hvid plet på blå baggrund.

Noter

1) p-Anisidin-saltsyre-reagens: reduktive carbonylforbindelser, såsom sukkerstoffer, reagerer med p-anisidin-saltsyre til udvikling af en farve, som er karakteristisk for de respektive strukturer.

2) Periodsyre-benzidin-reagens: polyalkoholer og forbindelser med en lignende struktur forbruger periodsyre. Således spores disse forbindelser ved en hvid plet.

3) 2,4-Dinitrophenylhydrazin-reagens: carbonylforbindelser reagerer med 2,4-dinitrophenylhydrazin til dannelse af 2,4-dinitrophenylhydrazon og spores ved en orange plet.

Som vist i den ovenstående tabel er produkterne og det autentiske glyceraldehyd fuldstændigt identiske med hensyn til Rf-værdier og farvning af farvereagenserne. Således bekræftes det, at det produkt, som opnås ved reaktion af glyceroloxidase med glycerol i nærvær af oxygen er glyceraldehyd.

(b)-2. Den mængde glyceraldehyd, som dannes når glyceroloxidase reagerer med glycerol i nærvær af oxygen, er næsten ækvimolær med den forbrugte mængde glycerol. Dette bekræftes ved tilsætning af 2,4-dinitrophenylhydrazin til reaktionssystemet til dannelse af 2,4-dinitrophenylhydrazonen af produktet og kvantitativ bestemmelse af det sidstnævnte produkt ved kolorimetri.

(c) Bekræftelse af oxygenoptagelsen:

Forbruget af oxygen i systemet, hvor glyceroloxidase reagerer med glycerol, måles ved hjælp af en oxygenelektrode og et Warburg-manometer. Herved bekræftes det, at den optagne mængde oxygen svarer til den dannede mængde glyceraldehyd.

(d) Kvantitativ bestemmelse af mængden af hydrogenperoxid, mængden af glyceraldehyd og den optagne mængde oxygen udføres ifølge de procedurer, som er beskrevet ovenfor under (a), (b) og (c). Herved findes, at de opnåede data er støkiometrisk rimelige.

II. Substratspecificitet:

Den relative aktivitet måles under anvendelse af andre substrater i ækvimolære mængder i forhold til mængden af glycerol ved proceduren til måling af aktiviteten ifølge 4-AA-metoden.

De relative aktiviteter på andre substrater er anført i tabel 3, hvor aktiviteten på glycerol er defineret som 100.

TABEL 3

Enzym / Substrat	Enzym fra Aspergillus	Enzym fra Neurospora
glycerol	100	100
1,2-propandiol	10,5	0
1,3-propandiol	3,3	0
1,3-butandiol	2,0	0
Glycerol-3-phosphorsyre	0,4	21
1,4-butandiol	0,3	0
2,3-butandiol	0,3	0
ethanol	0	0
n-propanol	0	0
isopropylalkohol	0	0

III. Optimalt pH og stabilt pH-område:

1. Den optimale pH-værdi for enzymet fra Aspergillus ligger i området 7-8.

Aktiviteterne måles efter inkubation ved 37°C ved forskellige pH-værdier i 10 mintter. Resultaterne er anført i fig. 2.

2. Det stabile pH-område for enzymet fra Aspergillus er 5,0-8,0.

Restaktiviteterne måles efter behandling ved 30°C og forskellige pH-værdier i 30 minutter under anvendelse af de følgende pufferopløsninger:

pH 4-5: acetat-pufferopløsning.

pH 6-7: tris-HCl-pufferopløsning.

pH 8-9: borat-pufferopløsning.

Resultaterne er anført i fig. 3.

3. Den optimale pH-værdi for enzymet fra Neurospora er 8,0-8,5.

   Aktiviteten måles efter inkubation ved 37° C og forskellige pH-værdier i 10 minutter. Resultaterne er anført i fig. 4.

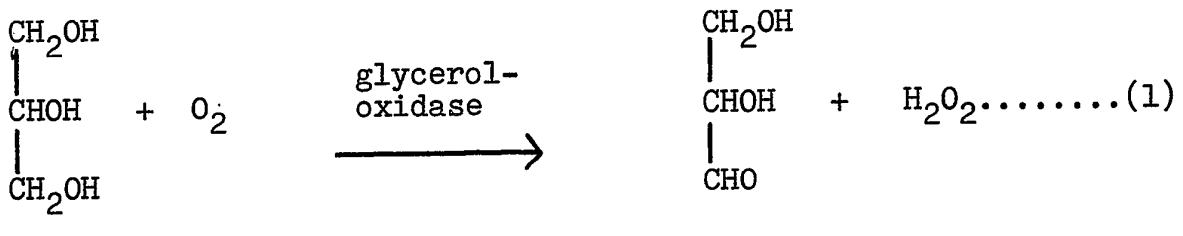
4. Det stabile pH-område for enzymet fra Neurospora er 5-8,0. Målingen udføres på samme måde som ovenfor under III-2. Resultaterne er anført i fig. 5.

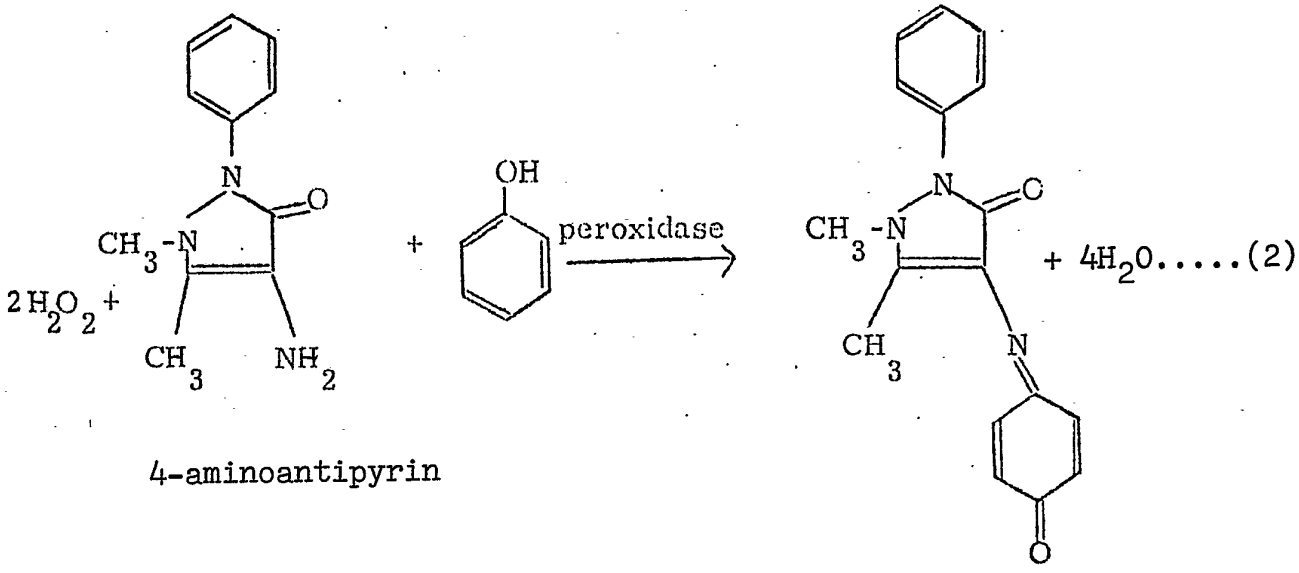
IV. <u>Procedure til bestemmelse af enzymaktiviteten:</u>

(a) Princip:

Bestemmelsen af enzymaktiviteten udføres ved omsætning af det af enzymet dannede hydrogenperoxid med 4-aminoantipyrin og phenol i nærvær af peroxidase til opnåelse af quinonimin-pigment og kvantitativ bestemmelse af det resulterende quinonimin-pigment.

Reaktionerne belyses ved de følgende ligninger (1) og (2):





4-aminoantipyrin

Reaktionsprincippet i ligning (2) er angivet af C.C. Allain et al.: Clin Chem. 20, 470 (1974).

(b) Reagenser:

(1)	Substrat: vandig 0,1M glycerol-opløsning	0,5 ml
(2)	Pufferopløsning: 0,1M ammonium-pufferopløsning (pH 8)	1,0 ml
(3)	4-aminoantipyrin: vandig 2,4 mM opløsning	0,5 ml
(4)	Phenol: vandig 42 mM opløsning	0,5 ml
(5)	Vandig peroxidaseopløsning: (proteinmængde 2 mg/ml, specifik aktivitet 100)	0,1 ml
(6)	Vand	0,3 ml
(7)	Vandig enzymopløsning	0,1 ml

(c) Arbejdsmåde:

Reagenserne (1)-(6) blandes i et reagensglas og rystes derpå ved 37° C i 5 minutter. Derpå tilsættes enzymopløsning, og den således opnåede blanding fyldes op til 3 ml med ammonium-pufferopløsning. Reaktionen gennemføres ved 37° C i 10 minutter under rystning. På den anden side gentages en lignende arbejdsmåde under anvendelse af vand i stedet for prøveopløsningen som reference. Den optiske tæthed af reaktionsopløsningen ved 500 nm måles, og differencen fra kontrollen bestemmes som ΔOD (optisk tæthed).

(d) Udregning af enzymaktiviteten:

En enhed glyceroloxidase er den mængde enzym, som vil nedbryde 1 /umol glycerol ved 37° C i løbet af 1 minut.

På den anden side er absorptionskoefficienten for 0,5 mM quinon-imin-pigment rapporteres som 5,33 Clin Chem. [20, 470 (1974)], og hvis den optiske tæthed (ΔOD) ved 500 nm af 3 ml af reaktionsopløsningen opnået ifølge den ovenstående arbejdsmåde IV-(c) repræsenteres ved a, udregnes den ønskede enzymaktivitet (A) pr. ml af enzymopløsningen således ud fra den følgende formel:

$$A = \underline{a} \times \frac{1}{5,33} \times 3 \times \frac{1}{10}$$

$$= \underline{a} \times 0,56 \text{ (enh./ml)}$$

OD værdier ved 500 nm af reaktionsopløsninger måles under ændring af reaktionstiden ved målingen af enzymaktiviteten, og der opnås de i fig. 6 viste resultater.

Det fremgår af fig. 6, at OD værdierne ved 500 nm er proportionale med reaktionstiderne.

V. Optimalt temperaturområde for virkning:

1) Enzym fra Aspergillus:

Enzymaktiviteterne efter inkubation ved pH 8 og forskellige temperaturer i 10 minutter er vist i fig. 7. Den optimale temperatur er omkring 40° C.

2) Enzym fra Neurospora:

Enzymaktiviteterne efter inkubation ved pH 8 og forskellige temperaturer i 10 minutter er vist i fig. 8. Den optimale temperatur er fra omkring 35 til omkring 45° C.

VI. Inaktiveringsbetingelser med hensyn til pH, temperatur osv.:

Inaktivering på grund af pH-tilstand:

Som beskrevet under III ovenfor med hensyn til den optimale pH-værdi og det stabile pH-område, inaktiveres enzymet fra Aspergillus i det væsentlige 100 % ved under pH 4 eller over pH 10. På lignende måde inaktiveres enzymet fra Neurospora i det væsentlige 100 % ved under pH 4 eller over pH 10.

Inaktivering på grund af temperatur:

Restaktiviteten måles efter varmebehandling ved pH 7,0 i 30 minutter i 0,1M tris-HCl-pufferopløsning.

Resultaterne med hensyn til enzymet fra Aspergillus er vist i fig. 9, og resultaterne med hensyn til enzymet fra Neurospora i fig. 10. Det førstnævnte er 100 % stabilt op til 40° C, men inaktiveres omkring 60 % ved 45° C. Det sidstnævnte inaktiveres omkring 50 % ved 30° C og omkring 100 % ved 50° C. Det førstnævnte (enzymet fra Aspergillus) stabiliseres ved tilsætning af 0,1 mM dithiothreitol, og dets termiske modstandsevne forøges også (se fig. 9, hvor det er stabilt op til omkring 50° C).

I det følgende skal beskrives en fremgangsmåde til kvantitativ bestemmelse af glycerol ved hjælp af det hidtil ukendte enzym glyceroloxidase, fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Den optiske tæthed af reaktionsopløsninger ved 500 nm bestemmes ifølge den arbejdsmåde, som er beskrevet ovenfor under IV-(c), under anvendelse af opløsninger indeholdende 0,1 mg af enzymet med en specifik aktivitet på 3,2 pr. ml af opløsningerne, idet koncentrationen af substratopløsningen (glycerol) ændres til 0,1 mM, 0,2 mM, 0,5 mM, 1,0 mM, 5,0 mM og 10,0 mM i det ovenstående afsnit IV-(b). Resultaterne er anført i tabel 4 og vist i fig. 11.

TABEL 4

Substrat-koncentration / OD værdi	0,1 mM	0,2 mM	0,5 mM	1,0 mM	5,0 mM	10,0 mM
OD værdi ved 500 nm	0.060	0,121	0,303	0,605	3,002	5,998

Det ses, at der er en lineær forbindelse mellem substratkoncentrationen (glycerolkoncentrationen) og OD-værdien for reaktionsopløsninger ved 500 nm. På basis af dette princip kan glycerol, som findes i opløsningen i en ukendt koncentration, bestemmes kvantitativt. Dette har f.eks. betydning ved kvantitativ bestemmelse af triglycerid ved hydrolyse af triglycerid i serum til dannelse af glycerol og fedtsyre og måling af glycerolet.

Der kendes en enzymatisk fremgangsmåde til kvantitativ bestemmelse af glycerol under anvendelse af glycerokinase (E.c.2.8.1.30), men reaktionen må udføres sammen med pyruvatkinase (E.c.2.7.1.40) og lactatdehydrogenase (E.c.1.1.1.27), hvorfor målingen tager meget lang tid, og derfor er fremgangsmåden uegnet til behandling af et stort antal prøver.

Opfindelsen belyses nærmere ved de efterfølgende eksempler.

EKSEMPEL 1

Aspergillus japonicus KY-45 (ATCC 1042, NRRL 11102, FERM-P No. 3959) podes i 300 ml podemedium indeholdende 10 g/l glycerol, 10 g/l maltekstrakt og 5 g/l gærekstrakt (pH 6,2 før sterilisering) i en 2 liters Erlenmeyer-kolbe og dyrkes ved 30° C under rystning i 48 timer. 900 ml (svarende til tre kolber) af den resulterende podekultur podes i 15 liter af det samme medium i et 30 liters gærkar og dyrkes ved 30° C under luftning (15 l/min.) og omrøring (250 omdr./min.) i 40 timer. Efter dyrkningen filtreres dyrkningsvæsken igennem en Büchner-tragt, og filterkagen vaskes med vand, hvorved der opnås omkring 150 g (tør basis) mikroorganismeceller.

Mikroorganismecellerne suspenderes i 5 liter 10 mM ammoniumpufferopløsning (pH 8,0) og sprænges i en "Dyno-mill" (fremstillet af Willy A. Bachofen, Schweiz). Efter sprængningen centrifugeres suspensionen i en frysecentrifuge (20 000 x G i 20 minutter), og der opnås 4,7 liter overvæske (proteinindhold 51 g, specifik aktivitet 0,05 enh./mg). Den resulterende overvæske blandes med ammoniumsulfat, og fraktioner udfældet ved 30-70 %

mætning med ammoniumsulfat opsamles og opløses i 50 ml 10 mM ammonium-pufferopløsning (pH 8,0). Den resulterende opløsning dialyseres mod 10 liter 10 mM ammonium-pufferopløsning under anvendelse af et cellophanrør som dialysemembran.

Dialysen fortsættes i 48 timer med i alt 40 liter dialyseopløsning, idet dialyseopløsningen udskiftes hver tolvte time. Den dialyserede enzymopløsning sendes igennem en søjle (5,5 x 40 cm) af DEAE-cellulose, som i forvejen er ækvilibreret med 10 mM ammonium-pufferopløsning (pH 8,0). Enzymet adsorberes herved, og uadsorberet forureningsprotein vaskes ud med den samme puffer. Derpå foretages eluering med en lineær gradient af 0,1 M til 0,2 M ammoniumsulfat i 2 liter 10 mM ammonium-pufferopløsning (pH 8,0), hvorved glyceroloxidase elueres. Der opsamles 500 ml af de aktive fraktioner (proteinindhold 1,2 g, specifik aktivitet 1,1), og de blandes med ammoniumsulfat til 70 % mætning og udfældning af enzymet.

Derpå opsamles bundfaldet ved filtrering (20 000 x G i 20 minutter) og opløses i 50 ml 10 mM ammonium-pufferopløsning (pH 8,0). Opløsningen sendes igennem en søjle (5,5 x 80 cm) af "Sephadex® G-100") fremstillet af Pharmacia Fine Chemicals, Co., Sverige), som i forvejen er ækvilibreret med 10 mM ammonium-pufferopløsning (pH 8,0). En liter 10 mM ammonium-pufferopløsning (pH 8,0) sendes igennem søjlen, og eluatet opnås i fraktioner. Fra fraktionerne opnås 300 ml af en fraktion med en høj specifik aktivitet (proteinindhold 310 mg, specifik aktivitet 3,2), som blandes med ammoniumsulfat til 70 % mætning og udfældning af enzymet. Derpå opsamles bundfaldet ved centrifugering (20 000 x G i 20 minutter) og opløses i 20 ml 10 mM ammonium-pufferopløsning (pH 8,0). Den resulterende opløsning dialyseres i 24 timer mod 5 liter 10 mM ammonium-pufferopløsning (pH 8,0) under anvendelse af et cellophanrør som dialysemembran, idet dialyseopløsningen udskiftes to gange. Efter dialysen sendes den resulterende enzymopløsning igennem en søjle (5,5 x 20 cm) af hydroxyapatit, som i forvejen er ækvilibreret med 10 mM ammonium-pufferopløsning (pH 8,0). Endvidere sendes 250 ml af den samme puffer igennem søjlen, og eluatet opnås i fraktioner. Fraktioner med en specifik aktivitet på over 20 opsamles og frysetørres, hvorved der opnås 10,2 mg renset pulverformet enzympræparat af

glyceroloxidase (specifik aktivitet 30,2). Det rensede enzym har en specifik aktivitet, som er omkring 610 gange så høj som celleekstraktens. Udbyttet er 19 % med hensyn til aktivitet.

EKSEMPEL 2

I stedet for Aspergillus japonicus KY-45 i eksempel 1 podes Neurospora crassa KY-462 (NRRL 11106, FERM-P No. 3960) i fem 2 liters Erlenmeyer-kolber indeholdende 10 g/l glycerol, 10 g/l maltekstrakt og 5 g/l gærekstrakt og dyrkes ved 30° C i 48 timer under rystning på samme måde som i eksempel 1.

Den resulterende dyrkningsvæske ekstraheres og renses på samme måde som i eksempel 1, hvorved der opnås 1,1 mg renset enzympræparat af glyceroloxidase (specifik aktivitet 14,1) i et udbytte på 10,5 % med hensyn til aktivitet.

EKSEMPEL 3

I dette eksempel gentages proceduren fra eksempel 1, undtagen at de fem stammer, som er vist i tabel 5, anvendes i stedet for Aspergillus japonicus KY-45. Glyceroloxidase-aktiviteterne af den resulterende overvæske af celleekstrakten er anført i tabel 5.

TABEL 5

Stammer	Aktivitet enh./l
Aspergillus oryzae KY 63 (NRRL 11103)	32,0
Aspergillus parasiticus KY 77 (NRRL 11104)	21,6
Aspergillus flavus KY 98 (NRRL 11105)	10,8
Neurospora sitophila KY 445 (NRRL 11264)	32,5
Neurospora tetrasperma KY 447 (NRRL 11265)	10,5

EKSEMPEL 4

(a) Anvendte reagenser:

(1)	Prøveopløsning: vandig glycerol-opløsning (koncentration ukendt)	0,5 ml
(2)	Pufferopløsning: 0,1M ammonium-pufferopløsning (pH 8)	1,0 ml
(3)	4-aminoantipyrin: vandig 2,4 mM opløsning	0,5 ml
(4)	Phenol: vandig 42 mM opløsning	0,5 ml
(5)	Peroxidase: vandig peroxidase-opløsning (proteinindhold 20 mg/ml, specifik aktivitet 1000)	0,1 ml
(6)	Vand	0,3 ml
(7)	Enzym: glyceroloxidase fremstillet i eksempel 1 (proteinindhold 1,0 mg/ml, specifik aktivitet 3,2)	0,1 ml

(b) Procedure:

De ovenstående reagenser (1)-(6) anbringes i et reagensglas og rystes grundigt ved 37° C i 5 minutter. Derpå tilsættes en enzym-opløsning, og reaktionsblandingen fyldes op til 3 ml med ammonium-pufferopløsning. Reaktionen gennemføres ved 37° C i 10 minutter under rystning.

På den anden side gentages den samme procedure under anvendelse af vand i stedet for prøveopløsningen som reference.

Prøveopløsningens OD-værdi ved 500 nm måles, og forskellen ΔOD fra referencen er 0,230. Af arbejdskurven i fig. 11 bestemmes glycerolindholdet i prøveopløsningen til at være 0,380 mM.

P a t e n t k r a v :

1. Glyceroloxidase, k e n d e t e g n e t ved, at den er identisk med det glyceroloxiderende enzym, der dannes ved dyrkning af en af mikroorganismerne Aspergillus japonicus KY-45 (FERM-P No. 3959, NRRL 11102), Aspergillus oryzae KY-63 (NRRL 11103), Aspergillus parasiticus KY-77 (NRRL 11104), Aspergillus flavus KY-98 (NRRL 11105), Neurospora crassa KY-462 (FERM-P No. 3960, NRRL 11106), Neurospora sitophila KY-445 (NRRL 11264) eller Neurospora tetrasperma KY-447 (NRRL 11265) i nærvær af glycerol.

2. Fremgangsmåde til fremstilling af glyceroloxidasen ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at en mikroorganisme tilhørende slægten Aspergillus eller slægten Neurospora dyrkes i et næringsmedium indeholdende glycerol i en mængde på 0,1 - 5 g/dl, og at enzymet udvindes fra den resulterende dyrkningsblanding.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at næringsmediet har en pH-værdi på 6 - 8 ved dyrkningens start, og at dyrkningen udføres ved en temperatur på 20 - 40 °C og under omrøring i et tidsrum på 30 - 72 timer.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes en mikroorganisme udvalgt blandt Aspergillus japonicus KY-45 (FERM-P No. 3959, NRRL 11102), Aspergillus oryzae KY-63 (NRRL 11103), Aspergillus parasiticus KY-77 (NRRL 11104), Aspergillus flavus KY-98 (NRRL 11105), Neurospora crassa KY-462 (FERM-P No. 3960, NRRL 11106), Neurospora sitophila KY-445 (NRRL 11264) og Neurospora tetrasperma KY-447 (NRRL 11265).

5. Fremgangsmåde til kvantitativ bestemmelse af glycerol i opløsning, k e n d e t e g n e t ved, at glycerolet omsættes med oxygen i nærvær af glyceroloxidasen ifølge krav 1, og at den forbrugte mængde oxygen eller den dannede mængde hydrogenperoxid eller glyceraldehyd måles.

6. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at det dannede hydrogenperoxid bestemmes kvantitativt ved omsætning af peroxidet med 4-aminoantipyrin og phenol i nærvær af peroxidase til opnåelse af quinonimin-pigment, som bestemmes kvantitativt ved måling af reaktionsopløsningens optiske tæthed ved 500 nm.

7. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at det dannede glyceraldehyd omsættes med 2,4-dinitrophenylhydrazin til dannelse af 2,4-dinitrophenylhydrazon, som bestemmes kvantitativt ved kolorimetri.

8. Fremgangsmåde ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at den forbrugte mængde oxygen måles ved hjælp af en oxygen-elektrode og et Warburg-manometer.

FIG. 1

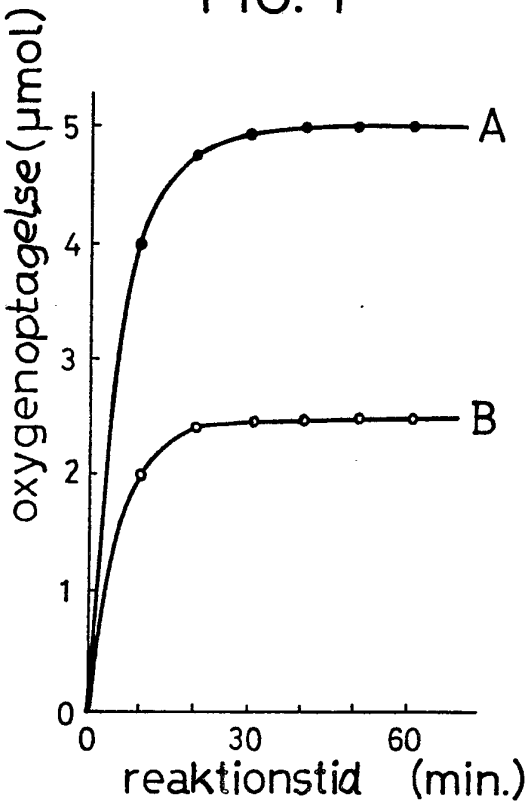

oxygenoptagelse (µmol)
5
4
3
2
1
0
A
B
0
30
60
reaktionstid (min.)

FIG. 2

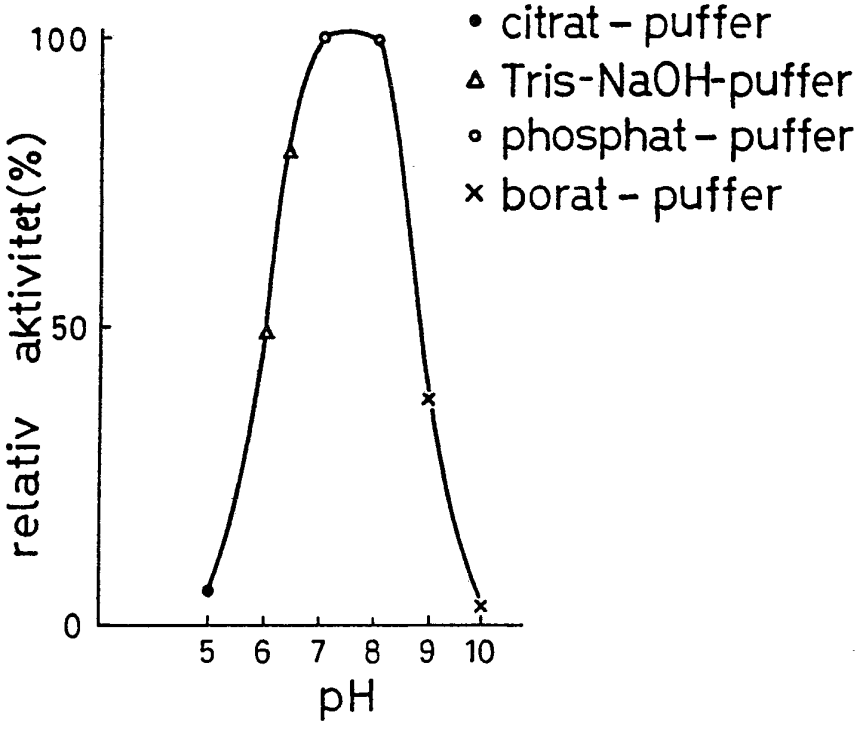

• citrat – puffer
▵ Tris-NaOH-puffer
◦ phosphat – puffer
× borat – puffer
relativ aktivitet (%)
100
50
0
5
6
7
8
9
10
pH

FIG. 3

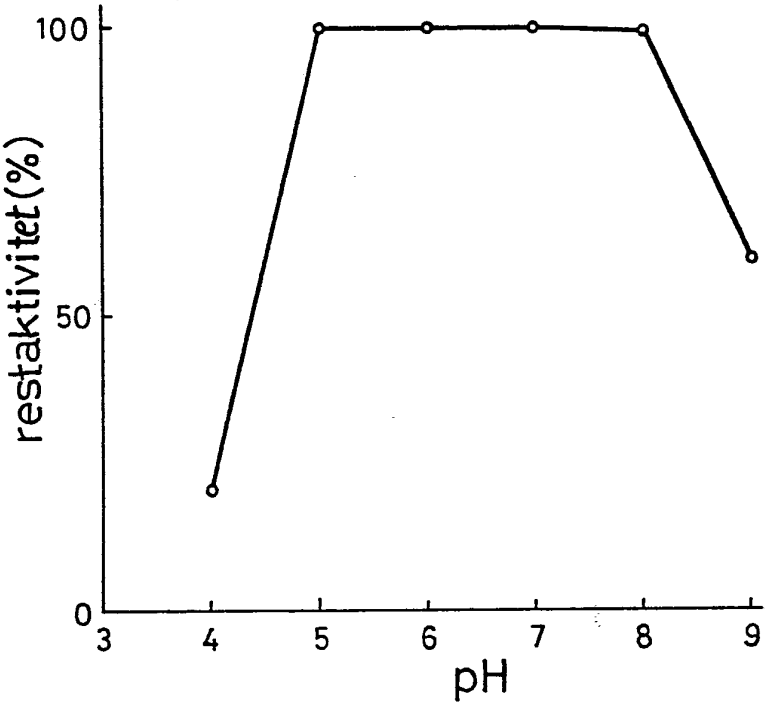

100
50
0
restaktivitet (%)
3
4
5
6
7
8
9
pH

FIG. 4

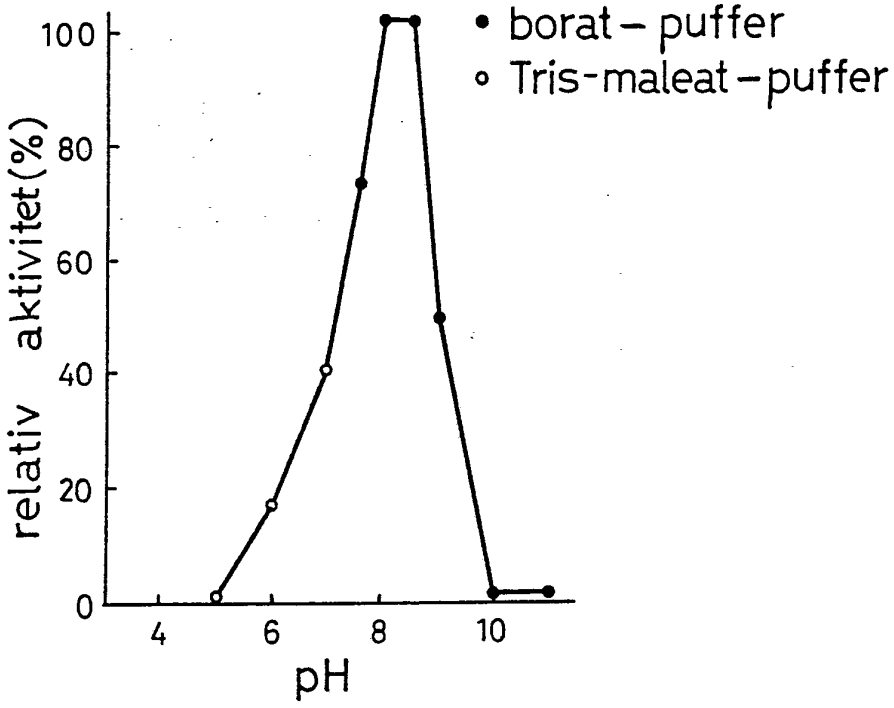

• borat – puffer
∘ Tris-maleat – puffer
100
80
60
40
20
0
relativ aktivitet (%)
4
6
8
10
pH

FIG. 5

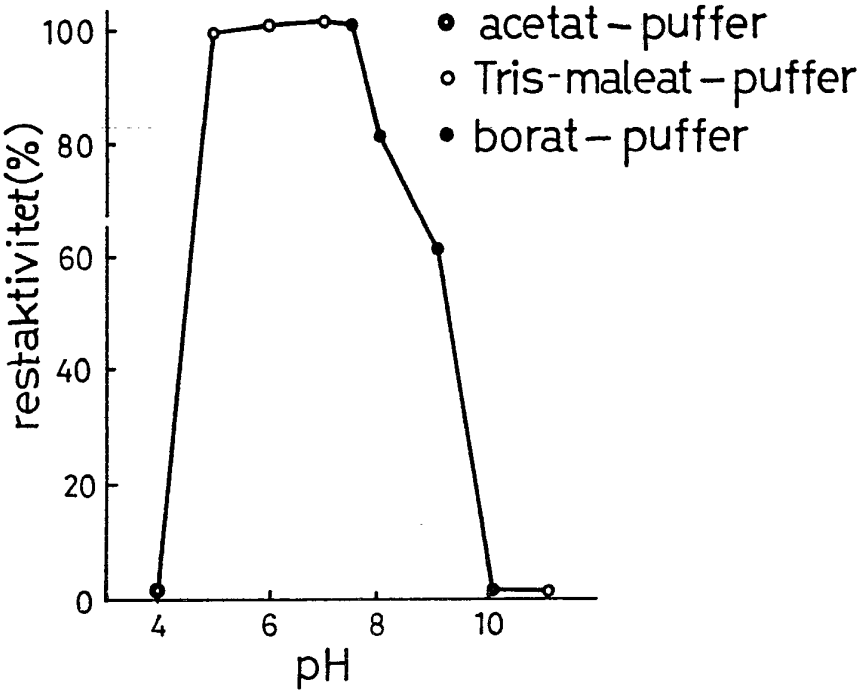

• acetat – puffer
○ Tris-maleat – puffer
• borat – puffer
restaktivitet(%)
100
80
60
40
20
0
4
6
8
10
pH

FIG. 6

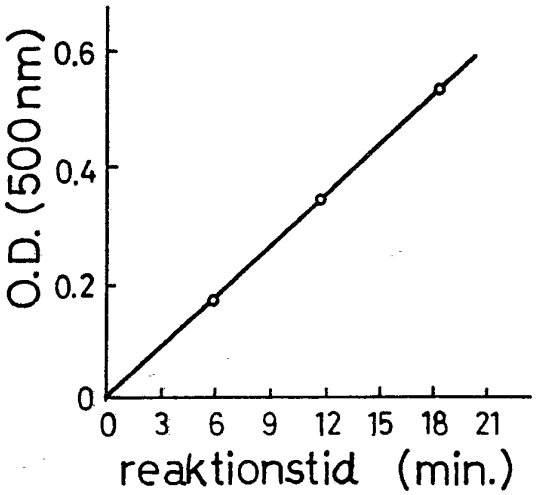

O.D. (500 nm)
0.6
0.4
0.2
0
0 3 6 9 12 15 18 21
reaktionstid (min.)

FIG. 7

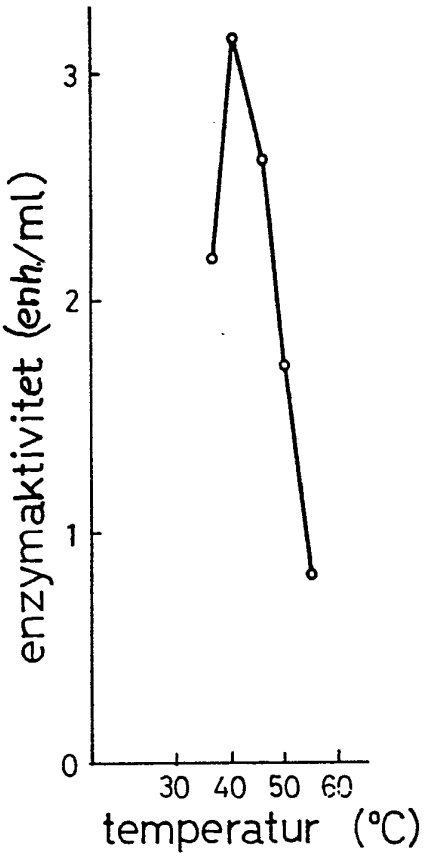

enzymaktivitet (enh/ml)
0
1
2
3
30 40 50 60
temperatur (°C)

FIG. 8

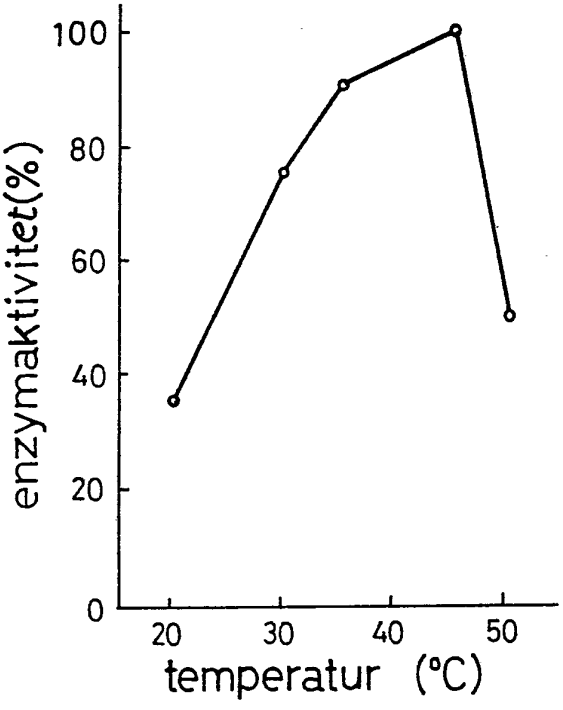

enzymaktivitet(%)
0
20
40
60
80
100
20 30 40 50
temperatur (°C)

FIG. 9

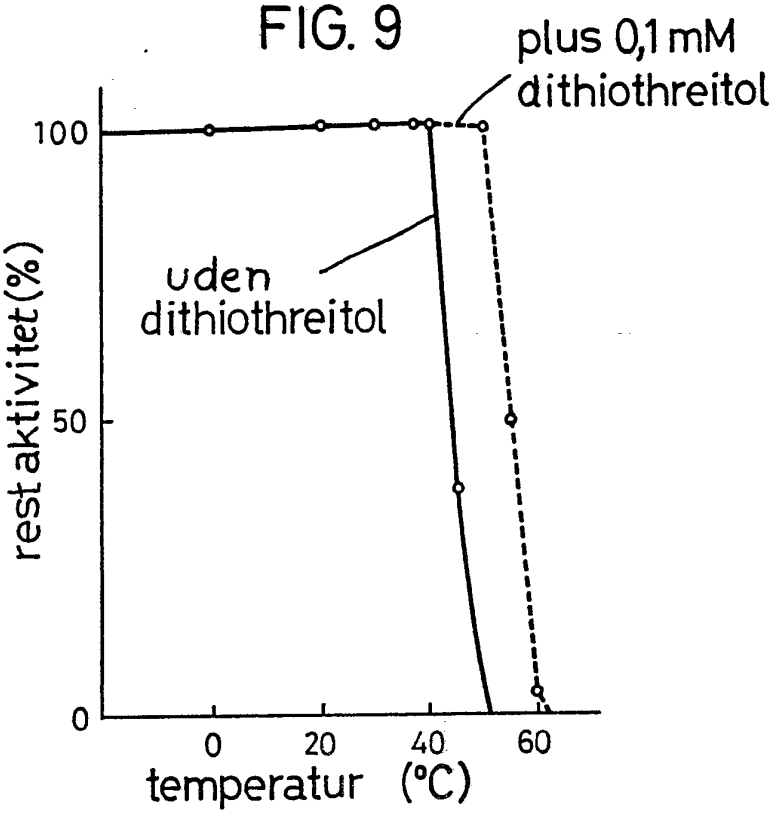

plus 0,1 mM
dithiothreitol
uden
dithiothreitol
rest aktivitet (%)
100
50
0
0
20
40
60
temperatur (°C)

FIG. 10

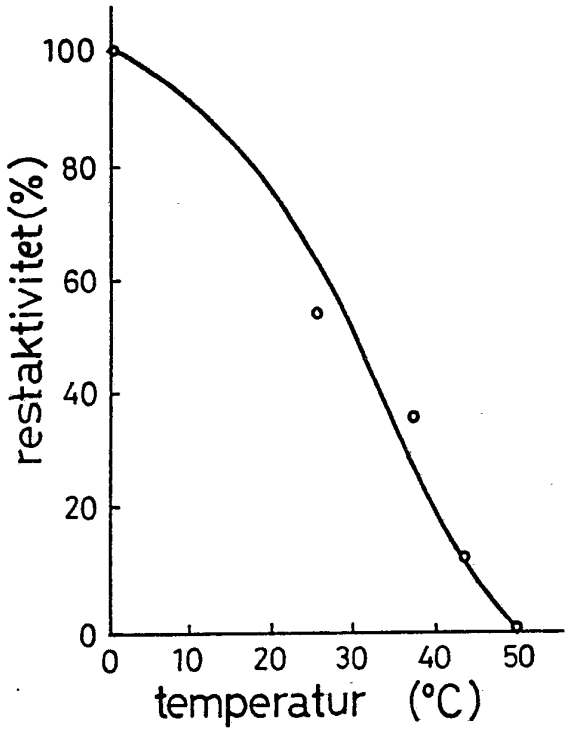

restaktivitet (%)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
temperatur (°C)

FIG. 11

