



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

203676

(11)

(B1)

/22/ Prihlášené 10.01.79
/21/ /PV 219-79/

(51) Int. Cl.³
C 13 L 1/08//
C 12 N 9/34

(40) Zverejnené 30.06.80

(45) Vydané 15.10.82

(75)

Autor vynálezu

KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA a ZEMEK JURAJ ing. CSc., LEHNICE

(54) Spôsob prípravy chromogénneho škrobového substrátu na stanovenie aktivity glukoamylázy

1

Vynález sa týka spôsobu prípravy chromogénneho škrobového substrátu na stanovenie glukoamylázovej enzýmovej aktivity.

Rýchle, jednoduché a spoľahlivé testy na kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie enzýmovej aktivity stali sa v praktickom živote nepostrádateľnými.

K najprogresívnejším metódam stanovenia úrovnice enzýmovej aktivity glukán-glukánohydroláz patrí kolorimetrická metóda založená na tom, že ako testovací substrát sa použije vhodný nerozpustný polysacharid s kovalentne viazaným farbivom.

Chromogénny, nerozpustný polysacharidový gél sa vplyvom prítomnej enzýmovej hydrolázy štiepa na rozpustné štiepne produkty, ktoré spolu s viazaným farbivom prechádzajú do roztoku, pričom intenzita farby roztoku je lineárne úmerná koncentrácii produktov hydrolýzy a tým aj koncentrácii prítomného enzýmu.

Tak napr. v prípade testovania alfa-amylázovej enzýmovej aktivity možno s výhodou použiť ako substrát chromogénny škrob, t. j. farebný polysacharid s väzbami alfa/1→4/, ktoré sa účinkom enzýmu alfa-amylázy štiepia [J. Kenedy: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 29, /1974/, str. 350-357, L. Kuniak, J. Zemek /čs. AO č. 192 210/].

Na základe výsledkov výskumu v tejto oblasti sa zistilo, že špecificky sieťovaný škrob s veľmi vysokým napúšťacím objemom vo vode 12 až 20 ml/g po kovalentnom naviazaní farbiva je vynikajúcim substrátom aj pre enzým glukoamylázu, /α-1,4-glukán glukohydrolázu, EC 3.2.1.3/ tak, že je ho možné použiť výhodne na kolorimetrické stanovenie glukoamylázy.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že zemiakový škrob sa v prvom stupni zosieťuje v 0,1 M hydroxide sodnom za použitia 0,1 až 1,0 % epichlórhydrínu na hmotnosť suchého škrobu, po dobu 2 až 24 hodín pri teplote miestnosti za stáleho miešania pri pomere kvapalnej a pevnej fázy 2:1, v druhom stupni sa nechá zosieťovaný škrob reagovať s dvojsodnou soľou kyseliny 8-amino-5-[3-/sulfoetyl-sulfonyl/ anilino]-6-antrachinonsulfónovej v množstve 4 až 20 % na hmotnosť suchého škrobu v 0,7 až 1,0 % hydroxide sodnom pri pomere kvapalnej a pevnej fázy 10:1 až 10:15 pri teplote miestnosti po dobu 1 až 2 hodiny, načo sa reakčná zmes neutralizuje ekvi-

valentným množstvom kyseliny octovej a nakoniec sa chromogénny škrob premýva na filtrí etanolom o koncentrácii 40 až 50 % do bezfarebnej reakcie filtrátu.

Najvýhodnejší zo škrobov je škrob zemiakový pre jeho vysokú chemickú čistotu, relatívne veľké rozmery zrna a dobrú filtrovateľnosť.

Sieťovanie s epichlórhydrínom je volené tak, aby napúšťací objem hotového chromogénneho škrobového gélu sa pohyboval v medziach 12 až 18 ml/g, čo je zárukou veľmi vysokej citlivosti na glukoamylázu. Pri nižších hodnotách stupňa napúčania je substrát nedostatočne citlivý pre rýchle sériové meranie glukoamylázovej enzýmovej aktivity. Optimálna doba sieťovania pohybuje sa za reakčných podmienok predmetu vynálezu okolo 4 hodín. Po prvom stupni sieťovania, prídávaním roztoku farbiva v alkalickom roztoku škrob asi do dvoch minút vytvorí pevný gel, ktorý sa nedá miešať a preto reakcia viazania farbiva prebieha staticky bez miešania. Nie je to však na prekážku rovnomernému priebehu reakcie viazania farbiva na škrob, pretože farbivo sa pridáva v rozpustenom stave a reakčná zmes sa dostatočne zhomogenizuje pokiaľ zoželatínuje do takeého stupňa, že sa miešanie musí zastaviť.

Po ukončení reakcie naviazania farbiva prídáním kyseliny octovej v zriedenom etanole /1:1/ sa tuhý škrobový gél prevedie na riedku suspenziu, ktorá sa opäť môže ľahko miešať a dobre filtrovať.

Premývanie je najpomalší technologický stupeň prípravy, nakoľko voľne nezreagované farbivo sa musí kvantitatívne z gélu vymyť, až je filtrát úplne číry. Obyčajne sa na to spotrebuje 70-až 100násobok zriadeného etanolu na hmotnosť pôvodného škrobu.

Keď je premývanie ukončené, nakoniec sa gél viacnásobne premýva na filtrí koncentrovaným etanolom, aby sa dokonale odstránila voda. Ak sa voda nedostatočne vytesní etanolom, gél pri sušení vytvára tvrdé hrudky čo je nežiaduce, nakoľko by sa musel suchý gél pomlieť.

Nakoniec sa etanol z gélu odstráni sušením voľne na vzduchu alebo v sušiarňi pri teplote 80 až 100 °C.

Suchý chromogénny, sieťovaný škrob má napúšťací objem vo vode 14 ml/g a je výborným substrátom pre kvantitatívne stanovenie glukoamylázy.

Pochopiteľne, pripravený gél je rovnako dobrým substrátom aj pre alfa-amylázu. Preto vo vzorkách, kde sa súčasne vyskytuje tak alfa-amylázová ako i glukoamylázová aktivita, najprv sa stanoví alfa-amylázovým testom alfa-amylázová aktivita, v druhom stanovení v novej vzorke sa stanoví alfa-amylázová i glukoamylázová enzýmová aktivita pomocou navrhovaného škrobového substrátu v tabletovej forme a ich rozdiel zodpovedá samotnej glukoamylázovej aktivite.

Výhodou navrhovaného spôsobu prípravy chromogénneho škrobového substrátu pre stanovenie glukoamylázovej aktivity je, že

umožňuje prípravu chromogénneho škrobu vo forme tablietiek, ktoré spĺňajú náročné požiadavky klinickej a prevádzkovej praxe pri sériovej analýze enzýmovej aktivity,

preparát sa môže vyrábať z domácich lacných surovín pomerne veľmi jednoduchým technologickým postupom;

výrobná cena pripraveného preparátu je mnohonásobne nižšia ako cena obdobných preparátov na svetovom trhu;

pri kombinácii s alfa-amylázovým testom umožňuje stanoviť vedľa seba tak alfa-amylázovú ako i glukoamylázovú enzýmovú aktivitu.

Príklady prevedenia

P r í k l a d 1

V 380 ml 0,1 M NaOH sa rozpustí 2 ml epichlórhydrínu pri teplote miestnosti potom sa pridá za stáleho miešania 220 g vzduchosuchého zemiakového škrobu a nechá sa reagovať za stáleho miešania pri teplote miestnosti po dobu 4 hodín. V osobitnej kádličke sa rozpustí 14 g pevného NaOH v 1 200 ml vody a v ďalšej kádličke osobitne sa rozpustí 8 g dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[3-/sulfoetyl-sulfonyl/anilino]-6-antrachinonsulfónovej /Kemazol Brilliant Blue R/ v 400 ml vody. Obe roztoky po vychladení na 20 °C sa zlejú dohromady a pridá sa naraz do reakčnej banky so sieťovaným škrobom, reakčná zmes sa dobre zamieša a asi po 2 minútach sa zmení na hustý gél, ktorý sa nechá 90 minút bez miešania doreagovať. Potom do

reakčnej banky sa vlejé asi 200 ml zriedeného etanolu /1:1/, do ktorého sa pred tým pridalo 20 ml koncentrovanej kyseliny octovej. Reakčná zmes zredne, dobre sa zamieša po dobu 5 minút a filtruje sa cez sklenený filter. Na filtri sa premýva zriedeným etanolom /1:1/ tak dlho až filtrát je úplne bezfarebný. Nakoniec škrobový gél sa premýva na filtri koncentrovaným etanolom. Etanol sa dokonale odsaje a škrobový gél sa suší na vzduchu alebo v sušiarňi pri teplote 80 až 100 °C. Suchý škrobový gél má napúšťací objem 14 ml/g.

P r í k l a d 2

Postup podľa príkladu 1, s tým rozdielom, že doba sietovania sa kráti na 2 hodiny, a ďalej sa pokračuje ako v príklade 1. Škrobový gél má napúšťací objem 16 ml/g.

P r í k l a d 3

Postup podľa príkladu 1, s tým rozdielom, že sa použije 10 g dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[3-/sulfoetyl-sulfonyl/anilino]-6-antrachinonsulfónovej. Pripravený gél sa dlhšie premýva, ale obsahuje viac viazaného farbiva, t. j. je citlivejší pri analytických stanovených enzýmových aktivitách.

P r í k l a d 4

Postup podľa príkladu 1, s tým rozdielom, že sa použije 0,2 ml epichlórhydrínu a sietovanie prebieha pri teplote miestnosti po dobu 24 hodín a na farbenie sa použije 40 g dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[3-/sulfoetyl-sulfonyl/anilino]-6-antrachinonsulfónovej. Výsledný suchý chromogénny škrobový gél má napúšťací objem 18 ml/g.

Vynález má uplatnenie všade, kde je potrebné sledovať úroveň glukoamylázovej aktivity či už v priemyselnej praxi ďalej vo výskume pri testovaní mikroorganizmov na glukoamylázovú enzýmovú aktivitu, a v klinickej praxi pre diagnostické účely niektorých ochorení.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy chromogénneho substrátu na stanovenie aktivity glukoamylázy, vyznačený tým, že zemiakový škrob sa v prvom stupni zosieťuje v 0,1 M hydroxide sodnom za použitia 0,1 až 1,0 % epichlórhydrínu na hmotnosť suchého škrobu, po dobu 2 až 24 hodín pri teplote miestnosti za stáleho miešania pri pomere kvapalnej a pevnej fázy 2:1, v druhom stupni sa nechá zosietený škrob reagovať s dvojsodnou soľou kyseliny 8-amino-5-[3-/sulfoetyl-sulfonyl/anilino]-6-antrachinonsulfónovej v množstve 4 až 20 % na hmotnosť suchého škrobu v 0,7 až 1,0% hydroxide sodnom pri pomere kvapalnej a pevnej fázy 10:1 až 10:15 pri teplote miestnosti po dobu 1 až 2 hodiny, načo sa reakčná zmes neutralizuje ekvivalentným množstvom kyseliny octovej a nakoniec sa chromogénny škrob premýva na filtri etanolom o koncentrácii 40 až 50 % do bezfarebnej reakcie filtrátu.