



OHĀD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

261524
(11) (B1)

[51] Int. Cl.⁴
C 12 N 9/00

[22] Prihlášené 29 10 86
[21] [PV 7806-86.D]

[40] Zverejnené 15 07 88

[45] Vydané 15 05 89

[75]

Autor vynálezu

KUNIAK LUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA,
ZEMEK JIŘÍ ing. CSc., LEHNICE

[54] Spôsob prípravy nerozpustného chromolytického substrátu na stanovenie C_x zložky celulázovej aktivity

1

2

Účelom riešenia je spôsob prípravy nerozpustného chromolytického substrátu na stanovenie C_x zložky celulázovej aktivity. Účel sa dosiahne tak, že na hydroxyetylcelulózu so stupňom substitúcie 0,15 až 0,25 sa kovalentne naviaže farbivo dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[3-(sulfoetylsulfonyl)]-6-antrachinom sulfónovej v prostredí vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentrácii 2 až 4 % hmot. po dobu 1 až 2 hodín pri teplote 15 až 20 °C, načo v druhom stupni sa vyfarbený produkt vyzráža nalieváním do mixéra s okyseleným etanolom pri otáčkach mixéra 1 500 až 2 500 za minútu. Riešenie má použitie v biochémií a biotechnológii a všade tam, kde je potrebné sledovať úroveň C_x zložky celulázovej aktivity.

Vynález sa týka spôsobu prípravy nerozpustného chromolytického substrátu na stanovenie C_x zložky celulázovej aktivity.

Na stanovenie C_x zložky celulázovej aktivity (endo- β -1,4-glukan glukanohydroláza, EC 3.2.1.4) sa používajú metódy viskozimetrické [T. M. Enari, P. Markkanen: in *Advances in Biochem. Engineering* (1977), T. K. Ghose, A. Fichter, N. Blakesbrough eds. Vol. 5, 24, Springer Verlag, Berlin, New York], nefelometrické [I. V. Gorbačova, N. A. Rodinova: *Biochim. Biophys. Acta* 484, 93 (1977)], [M. Nummi, P. C. Fox, M. L. Niku-paavola, T. M. Enari: *Anal. Biochem.* 116, 136 (1981)] a kolorimetrické za použitia príslušného chromolytického rozpustného alebo nerozpustného substrátu, ktorý po enzýmovej hydrolýze poskytuje farebný filtrát, intenzita ktorého je úmerná prítomnej enzýmovej aktivite [B. V. Mc Cleary: *Carbohydr. Res.* 86, 104 (1980)], [P. Biely, D. Mislavčová, R. Toman: *Anal. Biochem.* 144, 146 (1985)], [L. Kuniak, J. Zemek. *Čs. AO* 192 210 (1979)], [A. O. Stamm: *Helv. Chim. Acta* 46, 3 008 (1963)].

Nevýhodou doposiaľ známych a používaných metód stanovenia C_x zložky celulázovej aktivity je ich pomerná časová, prístrojová, resp. experimentálna náročnosť.

Uvádzané nedostatky rieši navrhovaný postup, ktorého podstata spočíva v tom, že na hydroxyetylcelulózu so stupňom substitúcie 0,15 až 0,25 sa kovalentne naviaže 5 až 8 perc. hmot. dvojsodnej soli kyseliny 8-amíno-5-[3-(sulfoetyl-sulfonyl)anilino]-6-antrachinón sulfónovej v prostredí vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentracii 2 až 4 % hmot. po dobu 1 až 2 hodín pri teplote 15 až 20 °C, načo sa vyzráža nalieváním do mixéra s okyseleným etanolom pri otáčkach mixéra 1 500 až 2 500 za minútu.

Zistili sme, že hydroxyetylcelulóza o nízkom stupni substitúcie je výhodnejším substrátom pre stanovenie C_x zložky celulázovej aktivity a patrí k neionogénnym derivátom celulózy v dôsledku čoho nedochádza u nej k nežiadúcim interakciám s celulázovým enzýmom. Ďalšou výhodou použitia nízkosubstituovanej hydroxyetylcelulózy je známa skutočnosť, že so stupňom substitúcie základného celulózového polyméru sa jeho substrátové vlastnosti pre celulázovú aktivitu zhoršujú až strácajú.

Doporučený stupeň substitúcie znižuje len v nepatrnej miere substrátové vlastnosti základného celulózového polyméru, a preto použitý derivát je dostatočne citlivý k celulázovej C_x zložke enzýmu. Keďže vlastné kovalentné viazanie použitého farbiva prebieha v homogénnej fáze dosahuje sa veľmi rovnomerná distribúcia chromogénnej substancie na makromolekule hydroxyetylcelózového reťazca, čo je podkladom pre lepšiu reprodukovateľnosť enzýmovej analýzy. Pri zrážaní vyfarbeného produktu je výhodné voliť otáčky mixéra medzi 1 500 až 2 500 za minútu, nakoľko pri týchto rýchlostiach

sa dosahuje optimálna veľkosť gélových častíc hydroxyetylcelulózy, t. j. 60 až 300 nm.

Tento rozmer veľkosti častíc je optimálny aj pre vymývanie nezreagovaného farbiva z hotového chromolytického produktu. Optimálne množstvo kovalentne viazaného farbiva pre tento typu celulózového substrátu je 5 až 8 % hmot. na hmotnosť východiskového derivátu celulózy.

Výhodou nového navrhovaného spôsobu prípravy substrátu pre stanovenie C_x zložky celulázovej aktivity je, že pripravený substrát má vysokú citlivosť k príslušnému enzýmu, má homogénne distribuované chromogénne skupiny, čo podmieňuje veľmi vysokú reprodukovateľnosť enzýmovej analýzy ako i skutočnosť, že nový substrát je neionogénny, takže pri jeho použití nedochádza ku nežiadúcim interakciám enzýmu so substrátom.

Príklad 1

5 g hydroxyetylcelulózy so stupňom substitúcie 0,15 sa rozpustí v 100 ml vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentracii 4 % hmot. Po rozpustení sa roztok ochladí na teplotu 15 °C a postupne sa k nemu za stáleho miešania pridáva roztok 0,5 g farbiva dvojsodnej soli kyseliny 8-amíno-5-[3-(sulfoetyl-sulfonyl)anilino]-6-antrachinón sulfónovej (Remazol brilliant blue R) v 100 mililitroch vody po dobu 30 minút, pričom sa teplota stále udržiava chladením na teplote 15 °C. Po pridaní celého objemu roztoku farbiva sa reakčná zmes ešte mieša 90 minút pri uvedenej teplote, po ktorej dobe je viazanie farbiva ukončené. Nato sa reakčná zmes tenkým prúdom nalieva do mixéra, v ktorom sa mieša 2 litre etanolu okyseleného s 10 ml koncentrovanej kyseliny octovej pri otáčkach mixéra 1 500 za minútu. Pridávanie roztoku vyfarbeného substrátu trvá 10 minút, načo sa nerozpustný produkt odfiltruje a na filtri premýva destilovanou vodou tak dlho, až odtekajúci filtrát je bezfarebný. Nakoniec sa voda z chromolytického substrátu vytesní alkoholom, resp. acetónom a použité organické rozpúšťadlo sa nechá odpariť z produktu pri laboratórnej teplote alebo vákuovo sa oddestiluje pri teplote do 50 °C.

Hotový suchý produkt o výťažku 5,2 g obsahoval 8,0 % hmot. viazaného farbiva, dobre napúchal vo vode na objem 9 ml/g a bol vhodným chromolytickým substrátom pre stanovenie C_x zložky celulázovej aktivity pri veľkosti častíc za sucha 80 až 300 nm.

Príklad 2

Postupuje sa ako v príklade 1 s tým rozdielom, že sa použije hydroxyetylcelulóza so stupňom substitúcie 0,25 a na farbenie sa použije 0,3 g farbiva a celková reakčná doba bola 60 minút pri teplote 20 °C, zráža-

nie sa previedlo pri otáčkach mixéra 2 500 až minútu. Výsledný produkt mal 5,1 % hmot. kovalentne viazaného farbiva a napúchal vo vode na objem 10 ml/g. Veľkosť častíc za sucha bola v rozsahu 40 až 200 nm.

Vynález môže nájsť uplatnenie v biochémii a biotechnológii, kde je potrebné stanoviť úroveň C_x celulózovej aktivity, a to tak pre výskumné účely, ako i v priemyslových aplikáciách.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy nerozpustného chromolytického substrátu na stanovenie C_x zložky celulózovej aktivity kovalentným viazaním farbiva v alkalickom prostredí na celulózový derivát vyznačený tým, že na hydroxyetylcelulózu so stupňom substitúcie 0,15 až 0,25 sa kovalentne naviaže 5 až 8 % hmot. farbiva dvojsodnej soli kyseliny 8-amíno-5-[3-

-[sulfoethylsulfonyl]anilino]-6-antrachinon sulfónovej v prostredí vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentrácii 2 až 4 % hmot. po dobu 1 až 2 hodín pri teplote 15 až 20 °C, načo sa v druhom stupni vyfarbený produkt zráža nalievaním do mixéra s okyseleným etanolom pri otáčkach mixéra 1 500 až 2 500 za minútu.