

FEDERÁLNY ÚRAD
PRE VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍU

274 026

(21) PV 8067-88.K
(22) Prihlášené 07 12 88

(40) Zverejnené 14 08 90
(45) Vydané 01 06 92

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁵
C 12 Q 1/54

(75) Autor vynálezu

MISLOVIČOVÁ DANICA ing. CSc.,
MARKOVIČ OSKAR ing. RNDr. DrSc.,
BIELY PETER RNDr. CSc., BRATISLAVA

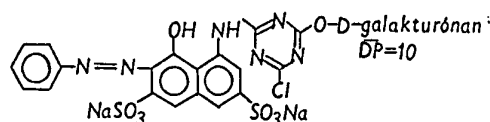
(54)

Dvojsodná sol' O-{4-chlór-6-[benzénazo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaf-8-yl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl} D-galakturonanu o priemernom stupni polymerizácie 10 a spôsob jej prípravy

(57)

Riešenie sa týka dvojsodnej soli O-{4-chlór-6-[benzénazo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaf-8-yl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl} D-galakturonanu o priemernom stupni polymerizácie 10, farbeného vodorozpustného substrátu, použiteľného na detekciu a stanovenie aktivity polygalakturonáz v preparátoch obsahujúcich pektolytické enzýmy a spôsobu prípravy. Podstata prípravy spočíva v tom, že 1 hmot. diel vodorozpustnej kyseliny oligo-D-galakturónovej o priemernom stupni polymerizácie 10 alebo jej sodnej, príp. draselnej soli reaguje vo vodnom roztoku s obsahom 0,8 až 1,2 hmot. dielov uhličitanu sodného alebo draselného za prítomnosti alkalickéj soli kyseliny octovej alebo minerálnej kyseliny s 0,6 až 1 hmot. dielom dvojsodnej soli 2,4-dichlór-6-[benzénazo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaf-8-yl)amino]-1,3,5-triazínu, vzniknutý roztok zafarbeného D-galakturonanu sa zneutralizuje kyselinou octovou alebo minerálnou kyselinou, 1 obj. diel zneutralizovaného roztoku sa zráža s 3,5 až 4,5 obj. dielmi roztoku obsahujúceho 2 až 3 obj. diely 96 %-ného etylalkoholu a 1 až 2 obj. diely acetónu a nenaviazané dichlórtriazínové farbivo sa odstráni vymývaním zrazeniny roztokom obsahujúcim 2 až 3 obj. diely 96 %-ného etylalkoholu, 1 až 2 obj. diely

acetónu a 1 obj. diel 0,6 až 1 %-ného vodného roztoku alkalickéj soli kyseliny octovej alebo minerálnej kyseliny.

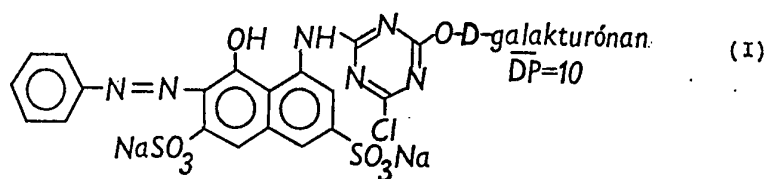


Vynález sa týka dvojsodnej soli O- {4-chlór-6-[benzénazo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonát-8-yl)amino]-1,3,5-triazín-2-yl} D-galakturónanu o priemernom stupni polymerizácie 10 a spôsobu jej prípravy.

Rozpustné kovalentne vyfarbené polysacharidy sa v poslednej dobe s úspechom používajú na rýchlu a jednoduchú detekciu príslušných hydroláz polysacharidov a tiež sú vhodné na stanovenie ich aktivity / B.V. Mc Cleary: Carbohydr. Res. 86, 97 (1980); P. Biely a spol.: Anal. Biochem., 144, 147 (1985); P. Biely a spol.: 172, 176 (1988)/. Farbivo sa obvykle viaže na polysacharid priamo na hydroxylovú skupinu éterickou väzbou alebo na derivatizovaný polysacharid. Princíp detekcie a stanovenia aktivity enzýmov spočíva v zmene rozpustnosti farebného polysacharidu v dôsledku hydrolýzy enzýmom a následnej tvorbe nízkomolekulárnych farebných fragmentov rozpustných v prítomnosti organického rozpúšťadla. V prípade pektín-degradujúcich enzýmov takýmto substrátom je kovalentne zafarbený pektín azo-farbivom N- {1-[4- [(3,6-disulfo-1-naftyl)azo] -naftyl]} -etyléndiamín, pripravený D. R. Friedom a G. W. Changom / J. Agric. Food Chem., 30 (5) (1982) 982/, v ktorom je farbivo viazané na pektín cez amidickú skupinu, pri vzniku ktorej sa používa ťažko dostupný katalyzátor - vodorozpustný karbodiimid. Iný druh farebného substrátu pre pektinázy je sodná soľ 2-[3-(1-amino-2-sulfoantrachinón-4-ylamino)fenylsulfonyl]-etyl -etyléndiamín derivátu pektínu / J. S. Huang, J. Tang: Anal. Biochem., 73, 369 (1976)/. Pripravuje sa v dvoch stupňoch. Najprv sa pripraví etyléndiamínoderivát pektínu a na ten sa potom viaže farbivo. Tento substrát sa však vyznačuje zlou rozpustnosťou v tlmivých roztokoch.

Bežné techniky viazania farbiva na polysacharid, ktoré nevyžadujú jeho derivatizáciu, v prípade kyseliny pektovej neposkytujú substrát s požadovanými vlastnosťami. Takýmto spôsobom vyfarbovania sa u kyseliny pektovej dosiahne veľmi nízky stupeň substitúcie farbivom. Získaný substrát neposkytuje enzymatickým štiepením nízkomolekulárne farebné fragmenty, ktoré by umožňovali jeho použitie na detekciu a stanovenie enzymovej aktivity. Enzýmom sa uvoľňujú iba nízkomolekulárne nefarebné fragmenty, pričom farbivo zostáva naviazané na polymérnom zvyšku, ktorý je nerozpustný v 60 % etylalkohole.

Uvedené nevýhody v podstatnej miere odstraňuje vodorozpustný chromogénny substrát dvojsodná soľ O- {4-chlór-6-[benzénazo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonát-8-yl)amino]-1,3,5-triazín-2-yl} D-galakturónanu s priemerným stupňom polymerizácie 10 vzorca I



Zistilo sa, že uvedenú dvojsodnú soľ O- {4-chlór-6-[benzénazo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonát-8-yl)amino]-1,3,5-triazín-2-yl} D-galakturónanu s priemerným stupňom polymerizácie 10 je možné pripraviť nasledujúcim spôsobom podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že 1 hmot. diel vodorozpustnej kyseliny oligo-D-galakturónovej o priemernom stupni polymerizácie 10 alebo jej sodnej, príp. draselnej soli reaguje vo vodnom roztoku s obsahom 0,8 až 1,2 hmot. dielov uhličitanu sodného alebo draselného za prítomnosti alkalickéj soli kyseliny octovej alebo minerálnej kyseliny s 0,6 až 1 hmot. dielom dvojsodnej soli 2,4-dichlór-6-[benzénazo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonát-8-yl)amino]-1,3,5-triazínu (dichlórtriazínové farbivo). Vzniknutý roztok zafarbeného D-galakturónanu sa zneutralizuje kyselinou octovou alebo minerálnou kyselinou. 1 obj. diel zneutralizovaného roztoku sa zráža s 3,5 až 4,5 obj. dielmi roztoku obsahujúceho 2 až 3 obj.

diely 96 %-ného etylalkoholu a 1 až 2 obj. diely acetónu. Neneviazané dichlórtriazinové farbivo sa odstráni premývaním zrazeniny roztokom obsahujúcim 2 až 3 obj. diely 96 %-ného etylalkoholu, 1 až 2 obj. diely acetónu a 1 obj. diel 0,6 až 1 %-ného vodného roztoku alkalickéj soli kyseliny octovej alebo minerálnej kyseliny. Výhodné je použiť na neutralizáciu takú kyselinu, ktorej sol' sa použije počas reakcie. Z hľadiska využitia dvojsodnej soli O- {4-chlór-6- [benzénazo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaf-8-yl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl} -D-galakturónanu o priemernom stupni polymerizácie 10 ako substrátu na detekciu a stanovenie aktivity pektináz, ktoré sa uskutočňuje v octanovom tlmivom roztoku, je výhodné použiť pri reakcii octan sodný a kyselinu octovú pri neutralizácii.

Výhodou dvojsodnej soli O- {4-chlór-6- [benzénazo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaf-8-yl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl} -D-galakturónanu o priemernom stupni polymerizácie 10 podľa vynálezu je, že sa získa farebný substrát rozpustný v tlmivých roztokoch, v ktorých sa uskutočňuje enzýmová reakcia. Ďalšia jeho výhoda je, že enzymatickým štiepením polygalakturonázou už pri prvom ataku uvoľňuje farebné fragmenty (DP 5), ktoré zostávajú rozpustené v supernatante po vyzrážaní nerozštiepeného substrátu organickým rozpúšťadlom.

Uvedené príklady ilustrujú, ale neobmedzujú predmet vynálezu.

Príklad 1

1 g kyseliny oligo-D-galakturónovej o priemernom stupni polymerizácie 10 sa rozpustí v 40 ml destilovanej vody pri teplote 30 °C a odfiltrujú sa nerozpustné podiely. Potom sa k filtrátu pridá 1 g dichlórtriazinového farbiva rozpusteného v 6 ml vody a mieša sa 10 minút pri teplote 30 °C. Potom sa pridá 0,5 g octanu sodného a zase sa mieša 10 minút pri tej istej teplote. Nakoniec sa pridá 12 ml 6 %-ného vodného roztoku uhličitanu sodného a mieša sa 2 hodiny pri 30 °C. Reakčná zmes sa potom zneutralizuje 2 M kyselinou octovou na pH 7 a vyzráža sa roztokom obsahujúcim 120 ml 96 %-ného etylalkoholu a 120 ml acetónu. Zrazenina sa odfiltruje na nuči a premýva roztokom obsahujúcim 1 diel 0,6 %-ného vodného roztoku octanu sodného, 2 diely 96 %-ného etylalkoholu a 2 diely acetónu až do slabo sfarbeného filtrátu. Potom sa zrazenina prezráža, a to tým spôsobom, že sa rozpustí v 50 ml 0,6 %-ného vodného roztoku octanu sodného a potom sa vyzráža roztokom obsahujúcim 100 ml 96 %-ného etylalkoholu a 100 ml acetónu. Premýva sa ako už bolo uvedené, až do bezfarebného filtrátu. Zrazenina sa premyje etylalkoholom, acetónom a vysuší sa.

Získal sa 1 g zrazeniny s obsahom farbiva 5,6 %.

Príklad 2

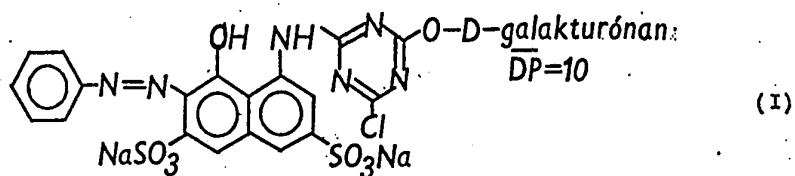
5 g Na-D-galakturónanu o priemernom stupni polymerizácie 10 sa rozpustí v 200 ml vody pri teplote 40 °C a pridá sa 5 g dichlórtriazinového farbiva rozpusteného v 40 ml vody a mieša sa 10 minút pri tej istej teplote. Potom sa pridá postupne 2,5 g octanu sodného a 60 ml 6 %-ného uhličitanu draselného a mieša sa 2 hodiny pri 40 °C. Potom sa reakčná zmes ochladí, zneutralizuje s 2 M kyselinou octovou a zráža za stálého miešania roztokom obsahujúcim 300 ml 96 %-ného etylalkoholu a 300 ml acetónu. Zrazenina sa prefiltruje cez nuč a vymýva ako v príklade 1. Potom sa prezráža, premyje a vysuší tým istým spôsobom ako v príklade 1.

Získalo sa 4,8 g zrazeniny s obsahom farbiva 6 %.

Vynález môže nájsť uplatnenie v potravinárskom, textilnom i tabakovom priemysle na detekciu a stanovenie aktivity polygalakturonáz v preparátoch obsahujúcich pektolytické enzýmy.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Dvojsodná soľ O- { 4-chlór-6- [benzénazo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-8-yl)amino] -1,3,5-triazin-2-yl } D-galakturónanu s priemerným stupňom polymerizácie 10 vzorca I



2. Spôsob prípravy zlúčeniny podľa bodu 1, vyznačujúci sa tým, že 1 hmotnostný diel vodorozpustnej kyseliny oligo-D-galakturónovej o priemernom stupni polymerizácie 10 alebo jej sodnej, prípadne draselnej soli reaguje vo vodnom roztoku s obsahom 0,8 až 1,2 hmotnostných dielov uhličitanu sodného alebo draselného za prítomnosti alkalickéj soli kyseliny octovej alebo minerálnej kyseliny s 0,6 až 1,0 hmotnostným dielom dvojsodnej soli 2,4-dichlór-6- [benzénazo-2-(1-hydroxy-3,6-bissulfonaft-8-yl)amino] -1,3,5-triazínu, vzniknutý roztok zafarbeného D-galakturónanu sa zneutralizuje kyselinou octovou alebo minerálnou kyselinou, 1 objemový diel zneutralizovaného roztoku sa zráža s 3,5 až 4,5 objemovými dielmi roztoku obsahujúceho 2 až 3 objemové diely 96 %-ného etylalkoholu, a 1 až 2 objemové diely acetónu a nenaviazané dichlórtriazínové farbivo sa odstráni vymývaním zrazeniny roztokom obsahujúcim 2 až 3 objemové diely 96 %-ného etylalkoholu, 1 až 2 objemové diely acetónu a 1 objemový diel 0,6 až 1,0 %-ného vodného roztoku alkalickéj soli kyseliny octovej alebo minerálnej kyseliny.