



ORAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

261525
(11) (B1)

[22] Prihlášené 29 10 86
[21] [PV 7809-86.J]

[51] Int. Cl.⁴
C 12 N 9/00

[40] Zverejnené 15 07 88

[45] Vydané 15 05 89

[75]

Autor vynálezu

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

(54) Testovacie tablety na stanovenie C_x zložky celulázovej aktivity

1

2

Účelom riešenia sú testovacie tablety na stanovenie C_x zložky celulázovej aktivity. Účel sa dosiahne tak, že tabletovací granulát obsahujúci 50 až 60 % hmot. chromolytického celulázového substrátu s veľkosťou častíc 60 až 300 μm s obsahom 5 až 8 % hmot. kovalentne viazaného farbiva dvojsodnej soli kyseliny 8-amíno-5-[3-(sulfoetylsulfonyl)anilino]-6-antrachinón sulfónovej, ďalej 40 až 50 % hmot. mikrokryštalickej celulózy s veľkosťou častíc 60 až 300 μm s obsahom 15 až 20 % hmot. viazaného 2-chlórmetyloxiránu na hmotnosť mikrokryštalickej celulózy a 3 až 4 % hmot. bielkoviny, s výhodou lyofilizovaného hovädzieho séra alebo rozpustnej frakcie vaječného bielka, sa po homogenizácii tabletuje na tabletovacím stroji na tablety o pevnosti 30 až 40 N o hmotnosti 100 mg s presnosťou ± 3 perc. Riešenie môže nájsť široké uplatnenie v biochémii a biotechnológii všade, kde je potrebné merať spoľahlivo úroveň C_x zložky celulázovej aktivity.

Vynález sa týka testovacích tablet na stanovenie C_x zložky celulózovej aktivity (endo- β -1,4-glukan glukanyhydroláza, EC 3.2.1.4).

Chromolytické vysokomolekulové substráty biopolymérov nachádzajú v súčasnej dobe široké uplatnenie pri stanovení najmä hydrolázových enzýmových aktivít pre svoju spoľahlivosť a pomernú jednoduchosť. Rýchly rozvoj biotechnológie vyvoláva potrebu vývoja ďalších a vhodnejších chromolytických substrátov, a to tak pre potreby základného výskumu, ako i výrobnéj praxe. Spoľahlivá metodika stanovenia enzýmových aktivít je limitujúcim faktorom pri objasňovaní biochemických reakcií v živých organizmoch a optimalizácii podmienok pri priemyselnej výrobe enzýmov. Metóda stanovenia hydrolázových enzýmových aktivít na nerozpustnom chromolytickom substráte je založená na skutočnosti, že príslušný substrát so zodpovedajúcim enzýmom hydrolyzuje na rozpustné farebné produkty, t. j. poskytuje po enzýmovej reakcii farebný roztok, intenzita ktorého je úmerná enzýmovej aktivite. Existujú už viaceré komerčné a v praxi overené tabletové testy najmä pre potreby humánnej diagnostiky, napr. tabletové testy na stanovenie úrovne alfa amylázy v krvnom sére a moči pri diagnóze funkčných porúch pankreasu; Phadebas Amylase Test [Clinical and technical information Almquist, Wirksell, Boktryckeri [1979]] a čsl. výrobok SPOFA TEST alfa amyláza [čs. AO 202 761(1980)].

Prax potvrdila, že tabletové testy na stanovenie enzýmových aktivít sú výhodnejšie oproti práškovej forme, pri ktorej je potrebné pre jednotlivé analýzy substrát presne navažovať. Pochopiteľne, substrát v tabletovej forme je výhodnejší, lebo testovacia tableta obsahuje presné množstvo potrebného chromolytického substrátu, prípadne potrebné množstvo zložiek ústrojného roztoku, ktoré vytvoria optimálne pH analyzovaného enzýmu. Okrem toho testovacia tableta nutne obsahuje i pomocné látky, ktoré podmieňujú optimálne mechanické vlastnosti tablety, a ktoré neinteragujú s prítomným enzýmom.

Z uvedených dôvodov nedajú sa pripraviť rovnakým postupom testovacie tablety pre rôzne typy enzýmov, ale na každý enzým sa spravidla musia voliť špecifické podmienky i zloženie tabletovej zmesi tak, aby testovacia tableta po styku s testovacím roztokom enzýmu sa rozpadla do 5 sekúnd a aby vytvorila homogénny gél v celom objeme analyzovaného pridaného roztoku. Takéto vlastnosti testovacej tablety spravidla podmieňuje pomocná inertná zložka, ktorou u alfa amylázových testov býva mikrokryštalická celulóza. U enzýmov, ktoré štiepia väzbu β (1 $\rightarrow$ 4) však mikrokryštalickú celulózu nemožno použiť, nakoľko je tiež substrátom aj pre zložku C_x celulózy.

Zistili sme však, že aj mikrokryštalickú celulózu možno modifikovať sieťovaním tak,

že nie je viac substrátom pre celulózové enzýmy a možno ju preto použiť ako pomocnú zložku pri tabletovaní chromolytického celulózového substrátu. Ďalej sme zistili, že u celulózových testovacích tablet je potrebné zvýšiť proteinové pozadie za účelom eliminácie nešpecifických interakcií mikrokryštalickej celulózy, ktoré by zhoršovali správnosť enzýmovej analýzy.

Keďže tabletové testy na stanovenie C_x zložky celulózovej aktivity nie sú doposiaľ vo svetovom meradle známe, je navrhované riešenie originálne.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že suchý tabletovací granulát obsahuje 50 až 60 perc. hmot. chromolytického celulózového substrátu s veľkosťou častíc 600 až 300 μ m a obsahom 5 až 8 % hmot. kovalentne viazaného farbiva dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[3-(sulfoetylsulfonyl)anilino]-6-antrachinón sulfónovej, ďalej 40 až 50 % hmot. mikrokryštalickej celulózy s veľkosťou častíc 60 až 300 μ m s obsahom 15 až 20 perc. hmot. viazaného 2-chlórmetylloxiránu na hmotnosť mikrokryštalickej celulózy a 3 až 4 % hmot. bielkoviny s výhodou lyofilizovaného hovädzieho séra alebo rozpustnej frakcie vaječného bielka. Testovacie tablety o pevnosti 30 až 40 N a pevnosť 100 mg s presnosťou ± 3 % sa vyrábajú na tabletovacom stroji.

Hotové tablety zloženia podľa vynálezu sú vhodné na stanovenie C_x zložky celulózovej aktivity najmä pri sériovom meraní. Ich hlavnou výhodou je dobrá reprodukovateľnosť a správnosť stanovenia meranej enzýmovej aktivity ako i značná úspora času najmä pri rutínnej prevádzkovej kontrole jednotlivých technologických postupov pri výrobe, izolácii a purifikácii celulózových enzýmov.

Testovacie tablety podľa vynálezu neobpH optimum celulózy z rôznych mikroorganizmov nie je rovnaké, čo by znemožňovalo porovnávať aktivity celulózy rozdielnych mikroorganizmov. Požadované pH optimum pre celulózy rozdielnych mikroorganizmov sa preto musia upraviť v meranom roztoku pred vlastným stanovením aktivity.

Príklad 1

500 g chromolytického substrátu (suchého) na stanovenie C_x zložky celulózovej aktivity s veľkosťou častíc 60 až 300 μ m a s 8 % hmot. kovalentne viazaného farbiva dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[3-(sulfoetylsulfonyl)anilino]-6-antrachinón sulfónovej sa homogenizuje s 460 g mikrokryštalickej celulózy zosietenej s 20 % hmot. epichlórhydrínu [2-chlórmetylloxiránu] s veľkosťou častíc 60 až 300 μ m, 20 g masťenca a 20 g hovädzieho lyofilizovaného albumínu, načo sa tabletuje na tabletovacom stroji na tablety o hmotnosti 100 mg s presnosťou ± 3 mg. Hotové tablety sa dobre

rozpadajú vo vode do 5 sekúnd a sú spoľahlivým substrátom pre stanovenie C₁ zložky celulázovej aktivity.

Príklad 2

Postup podľa príklad 1 s tým rozdielom, že na prípravu tabliet sa použilo 580 g chromolytického substrátu na stanovenie C₁ zložky celulázovej aktivity s veľkosťou častíc 60 až 300 μm a s 8 % hmot. kovalentne viazaného farbiva dvojsodnej soli kyseliny 8-amíno-5-[3-(sulfoethylsulfonyl)anilino]-6-antrachinón sulfónovej, 370 g mikrokryš-

talickej celulózy zosietenej s 20 % hmot. epichlórhydrínu (2-chlórmetryloxiránu) s veľkosťou častíc 60 až 300 μm , 20 g mastenca a ako bielkovina na vytvorenie proteínového pozadia sa miesto hovädzieho albumínu použije vodorozpustná frakcia vaječného bielka v množstve 30 g. Hotové tablety majú obdobné funkčné vlastnosti ako tablety podľa príkladu 1.

Riešenie môže nájsť široké uplatnenie v biochémií a biotechnológii všade, kde je potrebné merať spoľahlivo úroveň C zložky celulázovej aktivity.

PREDMET VYNÁLEZU

Testovacie tablety na stanovenie C₁ zložky celulázovej aktivity vyznačujúce sa tým, že obsahujú 50 až 60 % hmot. chromolytického celulázového substrátu s veľkosťou častíc 60 až 300 μm a obsahom 5 až 8 % hmot. kovalentne viazaného farbiva dvojsodnej soli kyseliny 8-amíno-5-[3-(sulfoethylsulfonyl)anilino]-6-antrachinón sulfónovej, ďalej 37 až 50 % hmot. mikrokryštalickej

celulózy s veľkosťou častíc 60 až 300 μm s obsahom 15 až 20 % hmot. viazaného 2-chlórmetryloxiránu na hmotnosť mikrokryštalickej celulózy a 3 až 4 % hmot. bielkoviny s výhodou lyofilizovaného hovädzieho séra alebo rozpustnej frakcie vaječného bielka, pričom pevnosť tabliet je 30 až 40 N a hmotnosť 100 mg $\pm$ 3 %.