



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

269 539

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl. 4
G 01 N 33/573

(21) PV 1655-88.S
(22) Prihlášené 14 03 88

(40) Zverejnené 12 09 89
(45) Vydané 31 08 90

(75)
Autor vynálezu

ZEMEK JIŘÍ ing. CSc., LEHNICE
BEJDOVÁ MĀRIA ing.,
JEŽO IVAN doc. ing., BRATISLAVA

(54) Spôsob prípravy chromolytického substrátu
k stanoveniu aktivity enzýmu endo-beta-1,4-
glukan glukanohydrolázy

(57) Riešenie sa týka prípravy chromolytického substrátu na stanovenie celulózy C₁ aktivity /endo-beta-1,4-glukan glukanohydrolázy, EC 3.2.1.4/ postupom, kedy vodorozpustná hydroxyetylcelulóza sa najprv sieťuje 2,2'-bis(oxiranylmetyl)éterom alebo 2-chlórometyloxiránom v reakčnej zmesi zloženej popri hydroxyetylcelulóze /1 hmotnostný diel/ z 6 až 12,5 hmotnostných dielov roztoku, pripraveného z 5 až 9 hmotnostných dielov metanolu alebo etanolu, jedného až 5 hmotnostných dielov destilovanej vody, 0,01 až 0,07 hmotnostných dielov hydroxydu sodného alebo draselného a 0,03 až 0,08 hmotnostného dielu sieťovadla, pri teplote 20 až 40 °C po dobu 2 až 8 hodín, na čo vymytý sieťovaný gél sa ďalej kovalentne farbí v prostredí 9 až 15 hmotnostných dielov destilovanej vody za prítomnosti 0,1 až 0,5 hmotnostného dielu hydroxydu sodného alebo draselného a 0,08 až 0,12 hmotnostného dielu farbiva, s výhodou dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[-3 /sulfoetyl-sulfonyl/anilino]-6-antrachinon-sulfonovej a ďalej sa pridá 0,3 až 0,7 hmotnostných dielov tuhého chloridu alebo síranu sodného a táto zmes sa nechá reagovať pri teplote 15 až 30 °C po dobu 1 až 3 hodín a chromolytická hydroxyetylcelulóza sa na to dokonale vymýva od nezreagovaného farbiva a suší. Riešenie má uplatnenie pri príprave štandardných substrátov celulózy C₁ vo forme tabletových monotestov, s uplatnením v biotechnológiach pri presných sériových

analýzach aktivity celulózy C₁ zložky, pri šľachtení mikroorganizmov, produkujúcich celulózu C₁, pri priemyselných kultiváciach producentov celulózy a pri dávkovaní celulózy do krmných zmesí, ako aj pri analýze enzýmového vybavenia mikrobiotory bacherových štaiv prežúvavcov.

Vynález rieši prípravu chromolytického substrátu vhodného na stanovenie celulázovej aktivity, beta-1,4-glukan glukanohydroláza.

V súčasnosti je známy celý rad metód stanovenia celulázovej C_x aktivity [beta-1,4-glukan glukanohydroláza, EC 3.2.1.4] a celý rad spôsobov vyjadrovania celulázovej C_x aktivity. Tieto metódy sú založené na stanovení koncentrácie uvoľnených redukujúcich cukrov [glukózy, celobiózy, celotriózy a pod.] z nativnej celulózy alebo jej derivátov. Tieto metódy sú však nešpecifické, nakoľko nezohľadňujú interferencie beta-glukanáz, pôsobiacich exo-mechanizmom [M.J. Bailey, K.M.H. Nevalainen, *Enzyme Microb. Technol.* 3, 143-159, 1981]. Viskozimetrické a nefelometrické metódy sú podstatne špecifickejšie ale natoľko zložité, že nevyhovujú k rutinným stanoveniam [T.M. Enari, P. Markkanen, *Advances in Biochemical Engineering*, /T.K. Chose, A. Fiechter, N. Blakesbrough, eds/, Springer Verlag, Berlin-New York, 1977, Vol.5, 1-14 ; M. Nummi, P.C. Fox, M.L. Niku-Paavola, Z.M. Tenari, *Anal. Biochem.* 116, 133-136, 1981]. Stanovenie celulázovej C_x aktivity sa zjednodušilo zavedením chromolytických substrátov, využívajúcich fyzikálnych interakcií niektorých chromofórov s celulózovým reťazcom alebo substrátov, obsahujúcich kovalentne viazané farbivo na reťazec amorfnej celulózy alebo jej analógu [J. Zemek, Z. Pavlicová, J. Kovář, Ľ. Kuniak, *Progress in Biotechnology*, Vol. 5, *Enzyme Technologies* /A. Blažej, J. Zemek, eds./ Elsevier Sci. Publ., Amsterdam-New York-London-Tokyo, 1988, 469-478]. Uvedené chromolytické substráty sú však neštandardné, s ohľadom na veľkosť povrchu fázového rozhrania, neoptimálne modifikované, vzhľadom na typ zavedenej funkčnej skupiny [nešpecifické interakcie s ionogénnymi karboxylovými skupinami] a neoptimálnom zosietení chromolytického gélu.

Uvedené nedostatky odstraňuje postup podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že v prvom stupni sa jeden hmotnostný diel hydroxyetylcelulózy sieťuje v 6 až 12,5 hmotnostných dieloch roztoku vzťahnuté na hmotnosť hydroxyetylcelulózy, pripraveného z piatich až deviatich hmotnostných dielov metanolu alebo etanolu, jedného až piatich hmotnostných dielov destilovanej vody, 0,01 až 0,07 hmotnostného dielu hydroxidu sodného alebo draselného a 0,03 až 0,08 hmotnostného dielu sieťovadla, s výhodou 2,2'-bis[oxiranylmetyl]éteru alebo 2-chlórometyloxiránu pri teplote 20 až 40 °C po dobu 2 až 8 hodín, na čo sa v druhom stupni získaný gél sieťovanej hydroxyetylcelulózy neutralizuje a premyje vodou a v treťom stupni sa sieťovaný gél hydroxyetylcelulózy suspenduje v 9 až 15 hmotnostných dieloch destilovanej vody na hmotnosť východiskovej hydroxyetylcelulózy a pridá sa jeden až dva hmotnostné diely vodného roztoku, obsahujúceho 0,1 až 0,5 hmotnostného dielu hydroxidu sodného alebo draselného a ďalej jeden hmotnostný diel vodného roztoku 0,08 až 0,12 hmotnostného dielu farbiva s výhodou dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[3/sulfoetyl-sulfonyl/anilino]-6-antrachinon-sulfónovej a ďalej sa pridá 0,3 až 0,7 hmotnostných dielov tuhého chloridu sodného alebo síranu sodného a táto zmes sa nechá reagovať pri teplote 15 až 30 °C po dobu 1 až 3 hodín a na to sa v štvrtom stupni reakčná zmes zneutralizuje a chromolytická hydroxyetylcelulóza sa dokonale vymyje od nezreagovaného farbiva najprv destilovanou vodou a potom zriedeným až koncentrovaným etanolom alebo acetónom a vysuší voľne na vzduchu alebo vákuovo pri 60 až 70 °C.

Pripravený gél chromolytickej sieťovanej hydroxyetylcelulózy sa frakcionuje na sítach na 0,25 až 0,35 mesh. Obsah viazaného farbiva na hydroxyetylcelulózovom géli je 6 až 9 hmotnostných %. Napučací objem sieťovaného chromolytického gélu je 10 až 16 ml.g⁻¹.

Výhodou uvedeného postupu je príprava substrátu ďalej aplikovateľného v enzýmovej analýze vo forme tabletového monotestu, čo zabezpečuje štandardizovateľnosť a unifiko-

vateľnosť analytického postupu. Výhodou je vysoká citlivosť pripraveného chromolytického substrátu a špecificita pre účinok celulózy C_x a rozsiahle pásmo linearity, ktoré uvedený substrát poskytuje v závislosti na aktivitách použitých celúláz C_x .

Priklad 1.

Do sklenenej 2 litrovej nádoby opatrenej miešadlom sa pridal etanol /0,5 kg/ a destilovaná voda /0,5 kg/ obsahujúce 0,8 g hydroxidu sodného a 2,4 g 2,2'-bis(oxiranylmetyl)éteru a 80 g hydroxyetylcelulózy /rozpustnej vo vode, poskytujúcej v svojom 2 % vodnom roztoku pri 25 °C viskozitu 5000 mPa.s/ a reakcia sieťovania sa uskutočnila pri teplote 20 °C po dobu 8 hodín. Sieťovaný gél sa zneutralizoval kyselinou octovou a premyl nadbytkom vody /2 x 1000 ml/ a suspendoval v 720 ml destilovanej vody a pridal sa 80 g roztoku destilovanej vody, obsahujúceho 8 g NaOH a ďalej 80 ml roztoku obsahujúceho 6,4 g dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[3/sulfoethylsulfonyl/anilino]-6-antrachinonsulfonovej a ďalej sa pridal 24 g tuhého chloridu sodného. Kovalentné farbenie sieťovaného gélu hydroxyetylcelulózy sa uskutočnilo pri teplote 15 °C po dobu 3 hodín. Potom sa reakčná zmes zneutralizovala a premývala postupne 3 x 1000 ml destilovanej vody na frite, potom 3 x 1000 ml etanolu /50 %/ a nakoniec sa suspendoval tento gél 3 x 500 ml etanolu /96 %/. Vymytý gél neobsahujúci fyzikálne zachytené farbivo sa vysušil na rotačnej vákuovej odparke pri 70 °C, mechanicky rozmelnil a vysitoval na site s 0,35 mesh. Obsah naviazaného farbiva bol 6 %. Napučací objem chromolytického celulóзовého gélu bol 16 ml.g⁻¹.

Priklad 2.

Do sklenenej 2 litrovej nádoby opatrenej miešadlom sa pridal etanol /0,9 kg/, destilovaná voda /0,1 kg/, obsahujúca 11,2 g Na OH a 12,8 g 2-chlórometyloxiránu a nakoniec 160 g hydroxyetylcelulózy /viskozita 1 % vodného roztoku pri 25 °C 1500 mPa.s/ a reakčná zmes sa miešala pri teplote 20 °C po dobu 8 hodín. Sieťovaný gél sa zneutralizoval kyselinou chlórôvodíkovou a premyl nadbytkom vody /2 x 1000 ml/ a suspendoval v 2,4 kg destilovanej vody obsahujúcej 80 g KOH a ďalej 160 ml roztoku obsahujúceho 19,2 g dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[3/sulfoethylsulfonyl/anilino]-6-antrachinonsulfonovej, pričom sa pridávalo súčasne 112 g siranu sodného. Kovalentné farbenie sieťovaného gélu hydroxyetylcelulózy sa uskutočnilo pri teplote 30 °C po dobu 1 hodiny. Potom sa reakčná zmes zneutralizovala a premývala postupne 3 x 2000 ml destilovanej vody na frite, potom 3 x 1000 ml etanolu /50 %/ a nakoniec sa tento gél suspendoval v 1000 ml acetónu, čo sa opakovalo 2 krát. Vymytý gél neobsahujúci fyzikálne zachytené farbivo sa vysušil pri izbovej teplote v digestori, mechanicky rozmelnil a vysitoval na site s 0,35 mesh. Obsah naviazaného farbiva bol 9 % hmotnostných. Napučací objem sieťovaného gélu chromolytickej hydroxyetylcelulózy bol 10 ml.g⁻¹.

Priklad 3.

Postupuje sa tak, ako je uvedené v príklade 1 s tým rozdielom, že namiesto etanolu sa použil metanol. Získaný gél chromolytickej hydroxyetylcelulózy obsahoval 7,2 % hmotnostného naviazaného farbiva, napučací objem gélu bol 14,8 ml.g⁻¹.

Priklad 4.

Postupuje sa tak, ako je uvedené v príklade 2, s tým rozdielom, že k sieťovaniu sa použije hydroxyetylcelulóza, ktorej 1 % vodný roztok poskytuje viskozitu 3500 mPa.s pri 25 °C. Pripravený sieťovaný gél chromolytickej hydroxyetylcelulózy obsahoval 6,5 % hmotnostných naviazaného farbiva a napučací objem vo vode mal 10,5 ml.g⁻¹.

Vynález má použitie v biotechnológiach pri presných sériových analýzach aktivity celulózovej C_x zložky, pri šľachtení mikroorganizmov produkujúcich celulózu C_x , pri priemyselných kultiváciach mikroorganizmov, produkujúcich celulózu C_x a pri dávkovaní celulózy do krmných zmesí, ako aj pri analýze enzýmového vybavenia mikroflóry bachorových štiav prežúvavcov.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Spôsob prípravy chromolytického substrátu na stanovenie aktivity endo-beta-1,4-glukanohydrolázy vyznačený tým, že jeden hmotnostný diel hydroxyetylcelulózy sa v prvom stupni sieťuje v 6 až 12,5 hmotnostných dielov roztoku vztiahnuté na hmotnosť hydroxyetylcelulózy, pripraveného z 5 až 9 hmotnostných dielov metanolu alebo etanolu, jedného až 5 hmotnostných dielov destilovanej vody, 0,01 až 0,07 hmotnostného dielu hydroxidu sodného alebo draselného a 0,03 až 0,08 hmotnostného dielu sieťovadla, s výhodou 2,2'-bis(oxiranylmetyl)éteru alebo 2-chlórometyloxiránu pri teplote 20 až 40 °C po dobu 2 až 8 hodín, na čo v druhom stupni získaný gél sieťovanej hydroxyetylcelulózy sa neutralizuje a premyje vodou a v treťom stupni sa sieťovaný gél hydroxyetylcelulózy suspenduje v 9 až 15 hmotnostných dieloch destilovanej vody na hmotnosť východiskovej hydroxyetylcelulózy a pridajú sa 1 až 2 hmotnostné diely vodného roztoku, obsahujúceho 0,1 až 0,5 hmotnostného dielu hydroxydu sodného alebo draselného a ďalej jeden hmotnostný diel vodného roztoku 0,08 až 0,12 hmotnostného dielu farbiva, s výhodou dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[3/sulfoethylsulfonyl/anilino]-6-antrachinonsulfónovej a ďalej sa pridá 0,3 až 0,7 hmotnostných dielov tuhého chloridu sodného alebo síranu sodného a táto zmes sa nechá reagovať pri teplote 15 až 30 °C po dobu 1 až 3 hodín a na to sa v štvrtom stupni reakčná zmes zneutralizuje a chromolytická hydroxyetylcelulóza sa dokonale vymyje od nezreagovaného farbiva najprv destilovanou vodou a potom zriedeným etanolom až koncentrovaným etanolom alebo acetónom a vysuší voľne na vzduchu alebo vakuovo pri 60 až 70 °C.

