



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENÍU

254163

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.⁴
C 12 N 9/14

(22) Prihlášené 09 08 85

(21) (PV 5815-85)

(40) Zverejnené 14 05 87

(45) Vydané 15 11 88

(75)

Autor vynálezu

KUNIAK EUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA, ZEMEK JIŘÍ ing. CSc.,
LEHNICE, HOLAN ZDENĚK ing., PRAHA

(54) Spôsob prípravy chromolytického substrátu na stanovenie
 $\beta(1\rightarrow3)$ glukánázy

1

2

Účelom riešenia je spôsob prípravy chromolytického substrátu na stanovenie beta glukánázy. Uvedeného účelu sa dosiahne tak, že v prvom stupni sa beta (1→3) glukán alkyluje etylénoxidom alebo kyselinou monochlóroctovou v alkalickom prostredí na stupeň substitúcie 0,2 až 0,3 a v druhom stupni sa na alkyl-polysacharid naviaže farbivo dvojsodná soľ kyseliny 8-amíno-5-[3-(sulfoethylsulfonyl)anilíno]6-antrachinón-sulfonovej v množstve 10 až 12 % hmot. na hmotnosť polysacharidu pri teplote 15 až 20 °C a koncentrácii hydroxidu sodného 1,0 až 2,0 % hmotnostných po dobu 2 až 4 hodín. Spôsob prípravy chromolytického substrátu na stanovenie beta-glukánázy má použitie v analytike enzýmov, biotechnológii a všade, kde treba pohotovo merať beta (1→3) glukánázovú enzýmovú aktivitu.

Vynález sa týka spôsobu prípravy chromolytického substrátu na stanovenie $\beta(1\rightarrow3)$ glukánázy, EC 3.2.1.6.

V posledných rokoch osvedčeným spôsobom stanovenia polysacharid-hydrolázových enzýmových aktivít je spôsob fotokolorimetrický. Spočíva v tom, že sa enzým nechá reagovať s nerozpustným polysacharidovým gélom, na ktorom je kovalentne viazané vhodné farbivo. Počas hydrolýzy účinkom prítomných príslušných enzýmov polysacharid-hydroláz stáva sa chromolytický gél postupne rozpustný, pričom intenzita zafarbenia supernatantu je úmerná aktivite enzýmu. Pochopiteľne, toto platí iba za predpokladu, že polysacharidový chromolytický gél je dokonale prístupný molekule enzýmu a že kovalentne viazané farbivo na polysacharid nemá inhibičný účinok na samotnú enzýmovú reakciu [K. Kenedy: *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry*, 29, [1974] str. 350—376]. Sú známe aj u nás postupy na prípravu rôznych polysacharidových chromolytických substrátov Čs. AO 192 210, 203 676, 219 575, 224 156. Jedná sa väčšinou o polysacharidy v prírode najčastejšie sa vyskytujúce a teda najviac výskumne i priemyslovo využívané. Príprava vodorozpustných chromolytických substrátov i vzácnějších polysacharidov je predmetom Čs. AO 237 101.

Je známe, že rôzne polysacharidy sa líšia chemickou a nadmolekulovou štruktúrou, ktorá sa musí rešpektovať pri príprave chromolytického substrátu vhodného pre stanovenie príslušnej enzýmovej polysacharid-hydrolázovej aktivity.

K málo preštudovaným mikrobiálnym polysacharidom patrí $\beta(1\rightarrow3)$ glukán, ktorý je súčasťou bunečných stien kvasinkových mikroorganizmov, z ktorých sa izoluje. Je to polysacharid nerozpustný vo vode a veľmi málo reaktívny pri následných modifikačných reakciách tak v alkalickom alebo kyslom prostredí. Z uvedených dôvodov je priame viazanie farbiva na tento polysacharid nevhodné za účelom prípravy dostatočne citlivého chromolytického substrátu pre stanovenie $\beta(1\rightarrow3)$ glukánázovej enzýmovej aktivity.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že v prvom stupni sa $\beta(1\rightarrow3)$ glukán alkyluje etylénoxidom alebo kyselinou monochlóroctovou v alkalickom prostredí na stupeň substitúcie 0,2 až 0,3 a v druhom stupni sa na alkyl-polysacharid naviaže farbivo dvojsodná soľ kyseliny 8-amino-5-[3-(sulfoetyl-sulfonyl)anilino]6-antrachinón-sulfonovej v množstve 10 až 12 % hmot. na hmotnosť polysacharidu pri teplote 15 až 25 °C a koncentrácii hydroxidu sodného 1,0 až 2,0 % hmot. po dobu 2 až 4 hodín.

Prípravený chromolytický gél má napúšťačí objem 12 až 15 ml/g, čo je dostatočné pre požadovanú citlivosť na stanovenie enzýmovej aktivity. Optimálny stupeň substitúcie je pre hydroxyetyl 0,2 a pre karboxyetyl 0,3.

Pri týchto úrovniach substitúcie má chromolytický gél maximálne výťažky a ešte sa pri vymývaní voľného farbiva nerozpúšťa vo vode. Pri vyšších stupňoch substitúcie sa už rýchlo zvyšuje rozpustnosť vo vode, čím dochádza ku značnej strate chromolytického gélu pri premývaní. Hydroxyetyl-derivát sa lepšie vyfarbuje ako karboxymetyl-derivát, posledný sa však ľahšie pripravuje.

Výhodou nového postupu prípravy chromolytického gélu $\beta(1\rightarrow3)$ glukánu je, že umožňuje pripraviť z tohto málo reaktívneho polysacharidu dostatočne citlivý enzýmový substrát vhodný pre kolorimetrické stanovenie príslušnej enzýmovej aktivity.

Príklad 1

200 g suchého $\beta(1\rightarrow3)$ glukánu izolovaného z bunečných stien kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* sa suspenduje v 200 ml etanolu (o koncentrácii 96 % hmot.), v ktorom sa predom rozpustilo 75 ml vodného roztoku hydroxidu sodného o koncentrácii 600 g.l⁻¹. Suspenzia sa mieša pri teplote 20 °C po dobu 40 minút a potom sa pridáva po častiach 40 g kyseliny monochlóroctovej. Reakčná zmes sa potom postupne vyhrieva na teplotu 55 °C v priebehu 1 hodiny a pri konečnej teplote 55 °C sa reakčná zmes udržiava za stáleho miešania celkovo 3 hodiny. Potom sa voľný hydroxid sodný neutralizuje konc. kyselinou octovou, reakčná zmes sa prefiltruje a na filtri sa nerozpustný karboxymetyl- $\beta(1\rightarrow3)$ glukán premýva najprv destilovanou vodou, potom alkoholom a alkohol sa odsaje. Produkt sa suspenduje v 2 litroch hydroxidu sodného o koncentrácii 2 % hmot. a pri teplote 15 °C sa po častiach pridáva v priebehu 30 minút farbivo dvojsodná soľ kyseliny 8-amino-5-[3-(sulfoetyl-sulfonyl)anilino]6-antrachinón-sulfonovej v množstve 20 g. Potom sa do roztoku pridá 100 g octanu sodného a reakčná zmes sa pri teplote 15 až 25 °C mieša 4 hodiny. Po ukončení vyfarbovania sa reakčný roztok zneutralizuje konc. kyselinou octovou, odsaje sa nerozpustný produkt a premýva sa na filtri destilovanou vodou tak dlho, až premývací voda je bezfarebná. Nakoniec sa voda z produktu vytesní etanolom a nakoniec sa etanol odparí voľne na vzduchu alebo vo vákuovej sušiarňi pri teplote do 60 °C. Vysušený produkt sa vytriedi na sítach a použije sa frakcia s veľkosťou častíc medzi 80 až 250 μ m. Hotový gél má napúšťačí objem vo vode 12 až 15 ml.g⁻¹ a je veľmi dobrým substrátom na stanovenie $\beta(1\rightarrow3)$ glukánázy.

Príklad 2

K 200 g suchého práškoveho $\beta(1\rightarrow3)$ glukánu izolovaného z bunečných stien kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* sa za miešania pridáva 200 ml vodného roztoku hydro-

xidu sodného o koncentrácii 20 % hmot. a nechá sa aktivovať po dobu 1 hodiny. Potom sa aktivovaný glukán zaleje v zatvorenom reaktore s 2 litrami acetónu a privádza sa cez ventil postupne 22 ml etylénoxidu. Reakčná zmes sa vyhreje na 40 °C a pri tejto teplote sa reakčná zmes udržiava 2 hodiny. Po ukončení reakcie sa voľný hydroxid sodný v reaktore neutralizuje konc. kyselinou octovou, nerozpustný produkt hydroxyetyl- $\beta(1\rightarrow3)$ glukán sa odfiltruje, premyje

vodou, nakoniec etanolom a ďalej sa vyfarbí podľa postupu v príklade 1 s 12 g farbiva dvojsodnej soli kyseliny 8-amíno-5-[3-(sulfoethylsulfonyl)anilino]6-antrachinónsulfonovej. Výsledný produkt $\beta(1\rightarrow3)$ glukán s kovalentne viazaným farbivom je veľmi dobrým substrátom na stanovenie $\beta(1\rightarrow3)$ -glukanázovej enzýmovej aktivity.

Vynález môže nájsť široké použitie v analytike enzýmov, biotechnológii pri meraní $\beta(1\rightarrow3)$ glukanázovej enzýmovej aktivity.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy chromolytického substrátu na stanovenie $\beta(1\rightarrow3)$ glukanázy, EC 3.2.1.-6 vyznačený tým, že v prvom stupni sa $\beta(1\rightarrow3)$ glukán izolovaný z bunečných stien kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* alkyluje etylénoxidom, alebo kyselinou monochlóroctovou v alkalickom prostredí na stupeň substitúcie 0,2 až 0,3 a v druhom stupni

sa na alkyl-polysacharid naviaže farbivo; dvojsodná soľ kyseliny 8-amíno-5-[3-(sulfoethylsulfonyl)anilino]6-antrachinónsulfonovej v množstve 10 až 12 % hmot. na hmotnosť polysacharidu pri teplote 15 až 25 °C a koncentrácii hydroxidu sodného 1,0 až 2,0 percent hmot. po dobu 2 až 4 hodín.