

ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA
(19)



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

267 157

(21) PV 9694-86.C
(22) Prihlášené 22 12 86

(40) Zverejnené 13 06 89
(45) Vydané 14 12 90

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 31/22

(75)

Autor vynálezu

KUNIAK ĽUDOVÍT ing. CSc., BRATISLAVA, ZEMEK JIŘÍ ing. CSc.,
LEHNICE, TKÁČ MICHAL RNDr. BRATISLAVA (CS), TAUFEL ALFRED dr.,
BERGHOLZ (DD)

(54)

Testovacie tablety na stanovenie mikrobiálnej alfa amylázy

(57) Účelom riešenia sú testovacie tablety na stanovenie mikrobiálnej alfa amylázy. Podstatou riešenia je, že testovacie tablety obsahujú 45 až 65 % hmot. mikrokryštalickej celulózy s veľkosťou častíc 60 až 300 μm , 30 až 50 % hmot. chromylitického škrobového substrátu s veľkosťou častíc 60 až 300 μm a obsahom 5 až 8 % hmot. kovalentne viazaného farbiva dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[3-(sulfoetyl-sulfonyl)-anilino]-6-antrachinon sulfonovej, ďalej 2 % hmot. mastenca a 2 až 3 % hmot. proteínu napríklad práškového hovädzieho albumínu alebo rozpustnej frakcie vaječného bielka, pričom pevnosť tabliet je 2,5 až 3,5 kp a hmotnosť 100 mg \pm 3 %. Riešenie môže nájsť uplatnenie najmä v analytike mikrobiálnej alfa amylázy, prípadne pri testovaní mikroorganizmov na alfa amylázovú aktivitu, ako i v biotechnológii pri príprave mikrobiálnej alfa amylázy.

CS 267 157 B1

Vynález sa týka spôsobu prípravy testovacích tabliet na stanovenie mikrobiálnej alfa amylázy; alfa(1 \rightarrow 4) glukán glukánohydroláza EC 3.2.1.1.

Hydrolázové enzýmové aktivity sa stanovujú spoľahlivo a pomerne jednoducho v posledných rokoch použitím príslušných chromolytických substrátov. Spravidla je stanovenie založené na tom, že nerozpustný chromolytický substrát sa nechá reagovať s roztokom, ktorého aktivitu meriame. Účinkom prítomného hydrolázového enzýmu sa nerozpustný chromolytický substrát štiepi na rozpustné farebné produkty, čím po prerušení enzýmovej reakcie a filtrácii rozpustného podielu sa získa farebný roztok, intenzita ktorého je priamo úmerná prítomnej enzýmovej aktivite. Existujú už viaceré komerčné a praxou overené tabletové testy, najmä pre potreby humánnej diagnostiky, napr. tabletové testy na stanovenie úrovne alfa amylázy v biologických tekutinách pri diagnóze funkčných porúch pankreasu; Phadebas Amylase Test [Clinical and technical information, Almquist, Wirksell's Boktryckeri (1979)] a čsl. výrobok SPOFA Test alfa amyláza [čs. AO č. 202 761 (1980)]. Prax potvrdila, že obzvlášť je výhodné, keď chromolytický substrát je upravený v tabletovej forme, čo u užívateľa značne šetrí pracnosť stanovenia najmä v rutínnej prevádzke oddelení klinickej biochémie, kde stanovenie alfa amylázy patrí k základným a najpočetnejším stanoveniam.

Ďalšou oblasťou kde sa vyžaduje obdobný test na stanovenie alfa amylázy je výroba priemyslových enzýmov zámerne produkovaných rôznymi mikroorganizmami najčastejšie baktériami, plesňami alebo hubami. Štúdiom rôznych typov alfa amylázy podľa typu mikrobiálnych producentov sa zistilo, že pH optimum mikrobiálnych amyláz nie je konštantné, ale značne kolíše. Z uvedených dôvodov známe alfa amylázové testy pre klinickú humánnu diagnostiku nie sú spoľahlivé pre rôzne typy mikrobiálnych amyláz. Kým ľudská alfa amyláza má pH optimum okolo 7, tak u mikrobiálnych amyláz táto hodnota leží v širokom rozsahu pH 5 až 9,5. Tieto poznatky je potrebné rešpektovať pri meraní rôznych typov amyláz, pretože nie je možné pre správne meranie absolútnych aktivít mikrobiálnej amylázy použiť tabletové testy určené pre stanovenie úrovne ľudskej amylázy v biologických tekutinách.

Uvedené nedostatky sú vyriešené testovacími tabletami na stanovenie mikrobiálnej alfa amylázy podľa vynálezu, ktorého podstatou je, že pozostávajú z 45 až 65 % hmot. mikrokryštalickej celulózy s veľkosťou častíc 60 až 300 μ m, 2 % hmot. mastenca, 2 až 3 % hmot. proteínu napríklad práškoveho hovädzieho albumínu alebo rozpustnej frakcie vaječného bielka a 30 až 50 % hmot. chromolytického škrobového substrátu s veľkosťou častíc 60 až 300 μ m s obsahom 5 až 8 % hmot. kovalentne viazaného farbiva dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[3-(sulfoetylsulfonyl)anilino]-6-antrachinon sulfonovej vo forme 100 mg \pm 3 % hmot. tabliet o pevnosti 2,5 až 3,5 kp.

Tabletové testy pre stanovenie mikrobiálnej alfa amylázy neobsahujú teda zložky zabezpečujúce pH optimum meranej enzýmovej aktivity podľa typu mikroorganizmu. Výhodou takto pripravených tabliet je ich univerzálnosť pre široký rozsah pH. Potrebné pH optimum pre alfa amylázy rozdielnych mikroorganizmov sa zabezpečuje tak, že pri analýze miesto destilovanej vody sa pipetuje predpísaný objem ústojného roztoku o potrebnom pH i ionovej sile. Takýmto spôsobom merané aktivity alfa amylázy sú správne a zrovnateľné pre rôzne typy mikroorganizmov produkujúcich tento dôležitý enzým. Spolu s ústojným roztokom sa dodáva aj prípadný aktivátor chlorid vápenatý.

Pre tabletový test na stanovenie mikrobiálnej alfa amylázy je vhodné použiť chromolytický škrobový substrát s napúčacím objemom vo vode 11 až 15 ml/g, čo podmieňuje dostatočnú citlivosť testu i pre nízke úrovne amylázovej aktivity.

Zistilo sa, že pre správnosť nameraných amylázových aktivít pre široké spektrum mikroorganizmov produkujúcich alfa amylázu je potrebné proteínové pozadie o niečo vyššie ako pre ľudskú alfa amylázu. Preto je potrebné zvýšiť obsah proteínu v testovacej tablete v rozsahu 2 až 3 %. Ako proteín je vhodný hovädzí albumín alebo rozpustná frakcia vaječného bielka v práškovej forme. Hlavnou výhodou nového tabletového testu je, že možno ním spoľahlivo

merať alfa amylázovú aktivitu produkovanú rôznymi mikroroganizmami. Okrem toho, nový test má všetky známe výhody tabletových testov; podstatnou mierou zrýchluje najmä sériové analýzy, šetrí pracovné sily a zvyšuje presnosť analýz. Je obzvlášť cenný v sériovej analýze najmä pri mikrobiálnej produkcii alfa amyláz pri medzioperačnej kontrole jednotlivých technologických operácií.

P r í k l a d 1

300 g chromolytického škrobového substrátu na stanovenie alfa amylázy s veľkosťou častíc 60 až 300 μm , napúčacím objemom vo vode 11 ml/g a obsahom 8 % hmot. kovalentne viazaného farbiva dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[3-(sulfoetyl-sulfonyl)anilino]-6-antrachinon sulfonovej, ďalej 650 g mikrokryštalickej celulózy s veľkosťou častíc 60 až 300 μm , 20 g hovädzieho práškoveho albumínu a 20 g mastenca sa homogenizuje za sucha a tabletuje na tableto-
tovacom stroji na tablety o pevnosti 2,5 kp a hmotnosti 100 mg s presnosťou ± 3 %. Tablety sa samočinne rozpadnú vo vode do 15 sekúnd, čo je postačujúce pre požadovanú presnosť a reprodukovateľnosť enzýmovej analýzy.

P r í k l a d 2

Postup ako v príklade 1 s tým rozdielom, že chromolytický škrobový substrát, v množstve 500 g, obsahoval 5 % hmot. kovalentne viazaného farbiva a mal napúčací objem vo vode 15 ml/g, ďalej sa použilo 450 g mikrokryštalickej celulózy a 3 % hmot. vodorozpustnej frakcie vaječného bielka v práškovej forme. Hotové tablety o pevnosti 3,5 kp majú analytické obdobné vlastnosti ako tablety podľa príkladu 1.

Riešenie má široké uplatnenie predovšetkým v analytike mikrobiálnej alfa amylázy, resp. pri testovaní mikroorganizmov na alfa amylázovú aktivitu.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

Testovacie tablety na stanovenie mikrobiálnej alfa amylázy, vyznačujúce sa tým, že pozostávajú zo 45 až 65 % hmot. mikrokryštalickej celulózy s veľkosťou častíc 60 až 300 μm , 2 % mastenca, 2 až 3 % hmot. proteínu napríklad práškoveho hovädzieho albumínu alebo rozpustnej frakcie vaječného bielka a 30 až 50 % hmot. chromolytického škrobového substrátu s veľkosťou častíc 60 až 300 μm s obsahom 50 až 8 % hmot. kovalentne viazaného farbiva dvojsodnej soli kyseliny 8-amino-5-[3-(sulfoetyl-sulfonyl)anilino]-6-antrachinon sulfonovej vo forme 100 mg ± 3 % hmot. tabliet o pevnosti 2,5 až 3,5 kp.