



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVEDČENIU

227588

(11)

(B1)

(61)

(23) Výstavná priorita
(22) Prihlásené 12 11 82
(21) PV 8072-82

(40) Zverejnené 26 08 83

(45) Vydané 01 06 86

(51) Int. Cl.³
C 12 Q 1/38

(75)

Autor vynálezu

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

(54) Spôsob prípravy univerzálnych testovacích tabliet na stanovenie proteolytickej enzýmovej aktivity

Vynález sa týka spôsobu prípravy univerzálnych testovacích tabliet na stanovenie proteázovej enzýmovej aktivity v biologických tekutinách a fermentačných pôdach.

Na stanovenie proteolytickej aktivity sa v zásade používajú dve metódy. Staršia metóda, ale ešte dosť používaná je založená na tom, že sa meria množstvo uvoľneného proteínu v priebehu proteolytickej hydrolýzy, ktoré sa stanovuje ako rozpustná frakcia v kyseline trichlóroctovej [M. Kunitz: J. Gen. Physiol. **30**, 291 (1947)], prípadne pomocou pozitívnej reakcie s fenolovým reagens podľa Folína [M. L. Anson: J. Gen. Physiol. **22**, 79 (1938)].

Druhá metóda, novšia, je založená na využití chromolytického substrátu na báze kazeínu, nie je bežne dostupná pre pomerne zložitú prípravu azokazeínu [S. Berman a spol.: Proc. Exptl. Biol. Med. **107**, 798-83 (1961)].

Veľmi citlivý chromolytický substrát možno pripraviť podľa (Aut. osv. č. 194 592) založený na sieťovaní a farbení rônych typov proteínu. Vyžaduje však lyofilizáciu vyfarbeného a premytého proteínu, čo je pomerne náročná technologická operácia.

Podstatne výhodnejší je spôsob prípravy chromolytického proteínového substrátu podľa PV 3546-81, ktorý už nevyžaduje lyofilizáciu premy-

tého proteínového substrátu ale je možné ho sušiť alkoholom.

Pri sériových analýzach je prášková forma chromolytického substrátu nie výhodná, pretože je potrebné pre každú analýzu zvlášť navažovať chromolytický substrát, čo znižuje produktivitu práce. Uvádzané nedostatky rieši nová prihláška vynálezu, ktorá umožňuje pripraviť tabletovú formu chromolytického proteínového substrátu, takže pre analýzu nie je potrebné chromolytický substrát jednotlivito navažovať ale použiť hotovú testovaciu tabletu.

Podstata vynálezu spočíva v tom, že suchý chromolytický proteínový substrát pripravený z hovädzieho sérového albumínu, ovoalbumínu, kazeínu alebo ich zmesí sa v prvom stupni zomelie na guľovom mlyne, presituje cez sito o veľkosti ôk 0,1 až 0,2 mm, načo sa v druhom stupni zmieša v mikrokryštalickou celulózu o priemere veľkosti častíc 0,06 až 0,1 mm v množstve 70 až 100 % hmot. na hmotnosť suchého proteínu a mastencom v množstve 2 až 3 % hmot. na hmotnosť tabletovej zmesi a treťom stupni sa zhomogenizovaná zmes tabletuje na tabletovacom stroji na tablety požadovanej hmotnosti s presnosťou ± 5 % hmot.

Zistili sme, že chromolytický proteínový substrát sa tabletovať na tabletovacom stroji nedá, pretože pri nízkych tlakoch sú tablety z hľadiska mechanic-

kých vlastností nevyhovujúce, nakoľko sa rozpadajú, zatiaľ čo pri vyšších lisovacích tlakoch sú tablety veľmi pevné a vo vode sa veľmi zle rozpadajú. Ukázalo sa výhodné chromolytický protein tabletovať s prídavkom 70 až 100 % hmot. mikrokryštalickej celulózy na hmotnosť proteínu. Za týchto okolností sú pripravené tablety dostatočne pevné a čo je dôležité veľmi dobre sa pri analýze vo vodnom prostredí rozpadajú, takže prítomný proteázový enzým má hneď na začiatku reakcie dostatočne prístupný chromolytický substrát v prebytku na enzymovú reakciu.

Optimálna veľkosť častíc chromolytického proteínu sa ukázala byť do 0,2 mm. Väčšie častice ako 0,2 mm by zhoršovali homogenitu tablet pri tabletovaní. Vďaka tomu, že mikrokryštalická celulóza má vysoké samomazacie vlastnosti pri práci na tabletovacom stroji nie je potrebné dávať do tabletovacej zmesi viac mastenca (ako mazadla) ako 2 až 3 % hmot. Mastenec ani mikrokryštalická celulóza, ktoré sú súčasťou testovacej tablety nie sú inhibítory proteázových enzýmov, takže ich prítomnosť v reakčnej zmesi neovplyvňuje proteázovú aktivitu.

Vzhľadom na to, že stanovenie proteázovej enzymovej aktivity prebieha za prítomnosti prebytku proteázového substrátu nie je potrebné vyžadovať vyššiu presnosť pri dodržiavaní hmotnosti vyrábaných testovacích tablet ako $\pm 5\%$ hmot.

Keďže proteázové enzýmy majú veľmi rozdielne pH optímá, testovacia tableta neobsahuje zložky tlmivého roztoku aby ju bolo možné použiť v tom rozsahu pH a to tak pre kyslé, tak aj pre neutrálne a alkalické proteázy.

Výhodou nového spôsobu prípravy chromolytických testovacích tablet na stanovenie proteolytickej aktivity je predovšetkým to, že substrát nie je treba navažovať pre jednotlivé analýzy, čo zvyšuje produktivitu práce najmä pri sériových analýzach či už v priemysle pri kontrole výroby proteolytických enzýmov, alebo v klinickej niochémii. Ďalšou výhodou tabletovej formy je, že sa môže dlhšiu

dobu chromolytický substrát v nej obsiahnutý skladovať bez zmeny fyzikálno-chemických vlastností.

Ďalšie prednosti nového postupu sú zrejmé z nasledovných príkladov, ktoré nie sú vyčerpávajúce ale len ilustratívne.

Príklad 1

2 kg suchého chromolytického proteínu pripraveného z hovädzieho sérového albumínu sa zomelie na guľovom mlyne, presituje sa cez sito o veľkosti ôk 0,2 mm a zmieša sa s 2 kg mikrokryštalickej celulózy o priemere častíc 60 až 100 mikrónov a 80 g mastenca ktorá zmes sa homogenizuje miešaním po dobu 2 hodín. Po homogenizácii sa suchý granulát tabletuje na tabletovacom stroji na tablety o priemere 7 mm a hmotnosti 100 mg s presnosťou $\pm 5\%$ hmot. Tablety majú dostatočnú pevnosť, takže sa pri manipulácii nedrobia a vo vode sa rozpadajú po dobu do 15 sekúnd. Sú vhodné a vysoko citlivé najmä na kyslé proteázy.

Príklad 2

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako protein použijeme chromolytický vaječný albumín v množstve 2 kg, 1,4 kg mikrokryštalickej celulózy a 100 g mastenca. Pripravené testovacie tablety majú podobné mechanické vlastnosti ako tablety pripravené podľa príkladu 1, ale sú citlivejšie predovšetkým na neutrálne a alkalické proteázy, menej citlivé na kyslé proteázy.

Príklad 3

Postup podľa príkladu 1 s tým rozdielom, že ako protein sa použije chromolytický kazein. Pripravené tablety majú obdobné mechanické vlastnosti ako u príkladov 1 a 2 ale sú rovnomerne citlivé ako na kyslé tak na neutrálne proteázy.

Vynález má uplatnenie predovšetkým v klinickej biochémii pri stanovovaní proteolytických enzýmov v biologických tekutinách ale i v priemyslovej aplikácii pri medzioperačnej kontrole kultivačných pôd pri výrobe proteolytických enzýmov.

PREDMET VYNÁLEZU

Spôsob prípravy univerzálnych testovacích tablet na stanovenie proteolytickej enzymovej aktivity z chromolytického proteinového substrátu vyznačený tým, že chromolytický proteinový substrát sa v prvom stupni zomelie na guľovom mlyne a presituje cez sito o veľkosti ôk 0,1 až 0,2 mm, načo sa v druhom stupni zmieša s mikrokryštalic-

kou celulózu o priemernej veľkosti častíc 60 až 100 mikrónov v množstve 70 až 100 % hmot. na hmotnosť suchého proteínu a mastencom v množstve 2 až 3 % hmot. na hmotnosť suchého granulátu a v treťom stupni sa tabletuje na tabletovacom stroji na tablety požadovanej hmotnosti s presnosťou $\pm 5\%$ hmot.