

Potenciometrické stanovení aktivity glukózooxidázy v preparátech z biologického materiálu

Ing. MILOSLAV RUT, RNDr., Ing. JAROSLAV HANUS, CSc., Česká akademie zemědělská v Praze — Výzkumný ústav potravinářského průmyslu v Praze

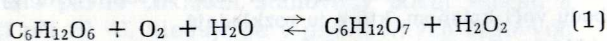
547.455.623
543.257

Měření aktivity glukózooxidázy ve shodě s obecnými zásadami stanovení aktivity enzymu je založeno na měření rychlosti úbytku substrátu nebo rychlosti tvorby produktů. V případě glukózooxidázy se může jednat o měření úbytku glukózy nebo kyslíku a přírůstku kyseliny glukonové nebo peroxidu vodíku. Nejznámější, nejstarší a nejvíce používanou je metoda měření spotřeby kyslíku v systému glukózooxidáza-glukóza-O₂ Warburgovou metodou [1]. Méně používané a přesné jsou metody měřící změny obsahu glukózy, kyseliny glukonové a peroxidu vodíku.

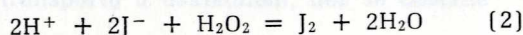
Všechny tyto metody mají některé nedostatky. Aby byly změny koncentrace dobře měřitelné, má reakce probíhat poměrně dlouho, např. v případě manometrické metody 10 až 30 minut. V naší laboratoři byla stanovena doba 20 minut pro získání objektivních výsledků. Ani tato podmínka neodpovídá základnímu požadavku definice mezinárodní jednotky [2], která požaduje měření na počátku reakce, protože vztah mezi množstvím zreagovaných složek a časem je lineární pouze v této oblasti. Pokud není možno stanovit počáteční rychlost, je málo přesné a problematické převádět uzanční jednotky stanovené některou z uvedených metod na jednotky mezinárodní. Dalším nedostatkem některých metod, zejména při měření aktivity surových preparátů a při prodloužené době reakce, je současné působení některých dalších enzymů. Tyto enzymy mohou metabolizovat substráty nebo produkty reakce katalyzované glukózooxidázou a ovlivňovat tak reakční rovnováhy a rychlosti. Například kataláza, která je běžným doprovodným enzymem glukózooxidázy získané při fermentaci *A. niger*, může podstatně zkreslit výsledek metod založených na měření úbytku kyslíku, nebo přírůstku peroxidu vodíku.

V roce 1964 navrhli *Pardue, Simon* a *Malmstadt* [3] aplikaci potenciometrické metody pro stanovení absolutní aktivity glukózooxidázy. Metoda je založena na měření rychlosti tvorby peroxidu vodíku při specifické katalýze oxidace β -D-glukózy kyslíkem

GOD



Vznikající peroxid vodíku okamžitě oxiduje v systému přítomný jodid na jód za přítomnosti Mo(VI)



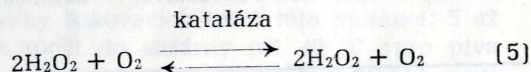
Koncentrace jódu se měří ze změny Ems koncentračního článku, jehož jedna elektroda je ponořena do reakční směsi a druhá elektroda do roztoku jódu známé koncentrace. Okamžitý rozdíl Ems je úměrný logaritmu okamžitého podílu koncentrací podle *Nernstova* zákona

$$E = k \ln \frac{C_2}{C_1} \quad (3)$$

Rychlost změny Ems, a tedy i $\Delta(I_2)$ je přímo úměrná aktivitě glukózooxidázy

$$\frac{\Delta E_{ms}}{\Delta t} = \text{aktivita} = \frac{\Delta I_2}{\Delta t} \quad (4)$$

Potenciometrická metoda má několik výhod. Největší praktickou výhodou je možnost záznamu změny potenčního rozdílu koncentračního článku na registračním přístroji. Při optimálních podmínkách bývá změna o 3 až 5 mV za 20 až 100 s, a proto lze aktivitu měřit velmi blízko počátku reakce. Základní výhodou je, že na měření aktivity glukózooxidázy nemá vliv kataláza, protože reakční rychlost reakce (2) je mnohem větší než rychlost rozkladu peroxidu vodíku katalyzovaného katalázou



Pardue, Simon a *Malmstadt* [3] zjistili, že žádné z činidel přítomných v reakční směsi nemá vliv na aktivitu glukózooxidázy, a proto se touto metodou měří absolutní jednotky aktivity.

Metoda je neobyčejně vhodná pro studie kinetiky glukózooxidázy; možno uvažovat o aplikaci pro její rychlost a pracovní nenáročnost pro kontrolu výroby.

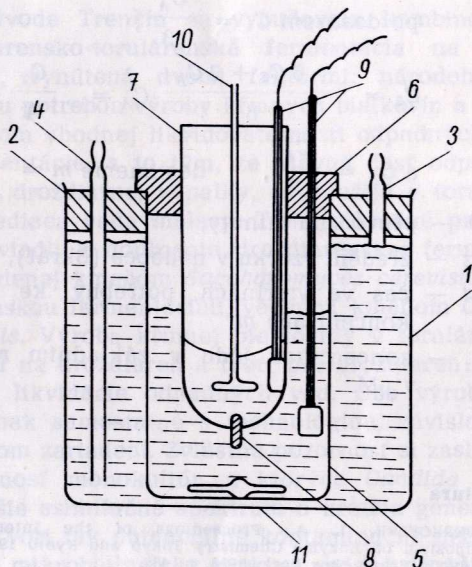
Vzhledem k uvedeným přednostem potenciometrické metody jsme se pokusili o její zavedení a aplikaci do podmínek naší laboratoře.

V porovnání s originální metodou jsme změnili některé části postupu a zařízení:

1. Originální nádobka je kádinka s pláštěm z jednoho kusu s vloženým teploměrem, míchadlem, elektrodou a baničkou na reakční směs. Celé zařízení jsme zjednodušili a zmenšili (*obr. 1*). Toto provedení nevyžaduje náročnou sklářskou práci. Elektrody tvoří Pt — plíšek 0,5 × 1 cm.

2. V originální metodě se používá přesný registrační potenciometr „null point Sargeant, model Q

concentration comparator“ s rozsahem 0 až 20 mV. Pro naše účely jsme aplikovali elektronkový kompenzační liniový zapisovač EZ 2 (Labora). Elektrody se zapojí na kablík vstupu. Aby Ems koncentračního článku byla v rozsahu stupnice tohoto přístroje, bylo nutno změnit složení srovnávacího roztoku jódu. EZ 2 má rozsah stupnice 0 až 5 mV, a proto lze sledovat přesně změny Ems o 2 až 4 mV. (Originální metoda předepisuje měřit část potřebný ke změně napětí koncentračního článku 5 mV.)



Obr. 1. Sestava reakčních nádobek s elektrodami

1 — temperační plášť, 2 — gumová zátka temperačního pláště, 3 — odvod temperační kapaliny, 4 — přívod temperační kapaliny, 5 — nádobka na srovnávací roztok, 6 — novodurová zátka, 7 — nádobka na reakční směs, 8 — vodivý spoj — azbestové vlákno, 9 — Pt elektrody, 10 — míchadlo reakční nádobky, 11 — magnetické míchadlo nádobky na srovnávací roztok.

3. Při pokusech o aplikaci originální metody pro EZ 2 jsme zjistili, že značný význam má složení srovnávacího roztoku a jeho iontová síla. Na našem zapisovači jsme nemohli nalézt nulovou polohu s originálními roztoky. Teprve když jsme změnili koncentraci jodidu a jódu, podařilo se nám Ems koncentračního článku změnit tak, že jsme mohli nulovou polohu zachytit. Složení roztoků jsme dále upravili tak, aby všechny potřebné pracovní roztoky se připravovaly ředěním jednoho základního faktorovaného roztoku jódu. Dále jsme upravili a zjednodušili kalibraci přístroje.

Použitá aparatura, chemikálie a roztoky

a) temperovaná sestava reakčních nádobek s elektrodami podle obr. 1,

b) registrační přístroj — elektronkový kompenzační liniový zapisovač EZ-2,

c) chemikálie

octan sodný bezv. p. a. Lachema,

ledová kyselina octová pro polovodiče Lachema,
glukóza apyrogenní Spofa,
jód resublimovaný nejčistší Lachema,
molybdenan amonný kryst. p. a. Lachema,

d) roztoky

1. pufr: 0,25 M acetátový pH 5,05

A) 20,5 bezvodého octanu sodného na 1 l

B) 14,4 ml ledové kyseliny octové na 1 l

Pufr se připraví smísením 200 ml A + 100 ml B a pH se upraví zředěnou kyselinou octovou nebo hydroxidem sodným na 5,05. Uchovává se v lednici.

2. roztok jodidu

4 g KJ se doplní na 100 ml. Přípravuje se nejlépe každý den.

3. roztok glukózy

22,5 g glukózy a 0,0925 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se rozpustí ve 125 ml pufru a doplní vodou na 250 ml. Uchovává se v lednici.

4. roztok jódu — základní

0,05 g jódu se smísí s 35 g KJ a doplní se na 1 l. Molarita se stanoví titrací sirnatem. [Koncentrace jódu C_Z .] Bývá okolo 200 μM . Uchovává se v temnu, dobře uzavřen.

5. srovnávací roztok jódu

Přípravuje se každý den zředěním základního roztoku jódu 1 : 1. Koncentrace bývá okolo 100 μM .

6. pracovní roztoky jódu

A — 25 ml základního roztoku jódu se doplní na 100 ml (okolo 50 μM) koncentrace

$$\text{jódu } C_A = \frac{C_Z}{4}$$

B — smísí se základní roztok jódu, roztok glukózy a jodidu 1 : 1 : 1 (koncentrace jódu

$$C_B = \frac{C_Z}{3}.$$

7. směs glukózy a jodidu

Přípravuje se každý den nová smísením roztoku glukózy a jodidu 1 : 1.

Pracovní postup

— Do vnější nádobky se nalije srovnávací roztok jódu, zapne se míchadlo a spustí ultratermostat (30,0 °C);

— do temperované lázně se vloží k vytemperování pracovní roztoky jódu, směs glukózy a KJ a zředěný vzorek;

a) kalibrace přístroje (posun papíru 20 mm/min, rozsah 50 X)

— do vnitřní nádobky se napipetuje 4 ml směsi glukóza + jodid a 2 ml prac. roztoku A (koncentrace jódu $C_1 = \frac{C_A}{3}$), pustí se míchadlo;

— zapne se registrační přístroj a ručička se na-

staví asi do levé první čtvrtiny stupnice a zaznamenává se napětí, až se podstatně nemění;

— do vnitřní nádoby se napipetují dále 2 ml pracovního roztoku B a vyčká se do ustálení ručičky. Odečte se rozdíl napětí v dílcích stupnice (koncentrace jódu $C_2 = \frac{6C_1 + 2C_B}{8}$;

b) *stanovení aktivity* (posun papíru 180 mm/min) — do vnitřní prázdné vypláchnuté nádoby se napipetují 4 ml směsi a 2 ml roztoku enzymu (0,05 až 0,1 U/ml) — oba vytemperované předem. Knoflík pro plynulé přestavení nulové polohy se dá na doraz doprava, knoflíkem pro přepínání nulové polohy skokem se vyhledá taková poloha, aby při správném zředění glukózooxidázy začala ručička zapisovat po 1 až 3 minutách.

Z grafu se odečte čas ve vteřinách, za který nastala stejná změna napětí jako při kalibraci (Δt). Přístroj se vypne a nádobka se vypláchne dvěma dávkami vody.

Trvání

Jedno stanovení trvá bez kalibrace 3 až 5 minut, kalibrace (1krát denně) 3 až 5 minut.

Přesnost

Spolehlivost metody jsme zkoušeli opakovanou kalibrací a opakovanou analýzou jednoho vzorku. Spolehlivost metody se pohybuje mezi 2,5 až 3,9 %. Z hlediska spolehlivosti je třeba věnovat pozornost pipetování malých objemů.

Přesnost metody nemohla být stanovena, protože nemáme k dispozici čistou glukózooxidázu.

Výpočet

$$A = \frac{m \cdot z \cdot 60}{\Delta t} = \frac{C_z \cdot 3 \cdot 60}{\Delta t \cdot 16} = 11,25 \frac{C_z}{\Delta t}$$

kde A — μ -moly peroxidu vodíku (jódu, kyslíku), vytvořené (spotřebované) enzymem obsaženým v 1 ml vzorku za 1 min při 30 °C a pH 5,1,

m — změna koncentrace jódu v μ M, způsobená činností glukózooxidázy (= rozdíl koncentrací při kalibraci) . $m = C_2 - C_1$;

$$\text{po dosazení } C_1 = \frac{C_A}{3} ;$$

$$C_2 = \frac{6C_1 + 2C_B}{8} \quad C_A = \frac{C_z}{4}$$

$$\text{a } C_B = \frac{C_z}{3}, \quad \text{dostaneme } m = \frac{C_z}{16}$$

60 — převod na minuty,

z — zředění vzorku v nádobce (3krát),

Δt — čas ve vteřinách, potřebný ke změně koncentrace m ,

C_z — koncentrace jódu v základním roztoku v μ M.

Literatura

- [1] UNDERKOFER, L. A.: Proceedings of the International Symposium on Enzyme Chemistry Tokyo and Kyoto 1957. Academic Press, New York, 1958, p. 486.
- [2] International Union of Biochemistry, Commission on Enzymes, Vol. 20, pp. 10, 11, Pergamon Press, New York 1961.
- [3] PARDUE, H. I. - SIMON, R. K. - MALMSTADT, H. V.: Anal. Chem. 36, 1934, s. 735.