

Stanovenie laminarinázovej aktivity za použitia chromolytického (1→3)- β -D-glukanu v tabletovej forme

579 663

ING. VIERA MONCOLOVÁ, Pivovary a sladovne, š.p., Výskumno-vývojová základňa, 816 13 Bratislava
ING. JIŘÍ ZEMEK, CSc., Ústav biotechnológie, Slovenská vysoká škola technická, 812 37 Bratislava

Kľúčové slová: S-test Laminarináza, stanovenie, aktivita, (1→3)- β -D-glukan, tabletová forma

ÚVOD

Laminarináza (endo-1,3- β -D-glukan glukanohydroláza E.C.3.2.1.39) patrí do skupiny enzýmov lyzujúcich bunkové steny kvasiniek, kvasinkovitých organizmov, mikroskopických a vyšších klobúkatých húb. Uvedené organizmy ako Basidiomycetes obsahujú totiž ako rigidnú zložku bunkových stien 1,3- β -glukan. Glukan bunkovej steny býva doprevádzaný α -mananom alebo β -mananom, chitínom, prípadne chitosanom. K lýze bunkových stien sa preto používa komplexný enzýmový systém obsahujúci hydrolázové aktivity, schopné štiepiť uvedené štruktúrne biopolyméry α -mananáza (α -D-manozid-mano-hydroláza E.C.3.2.1.24), β -mananáza (β -D-manozid-mano-hydroláza E.C.3.2.1.25), chitináza (chitodextrináza, poly-1,4- β -(2-acetamido-2-deoxy-D-glukozid)-glykano-hydroláza E.C.3.2.1.14 laminarináza. Uvedený komplex enzýmov obsahuje napr. šťava zažívacieho traktu slímaka (*Helix pomatia*), využívaná hlavne vo výskume, pri príprave protoplastov uvedených mikroorganizmov, ďalej extracelulárne enzýmy niektorých mikroorganizmov z rodov *Penicillium*, *Oerskovia*, *Arthrobacter* a pod., využívaných v priemyselnom merítku. Enzýmy lyzujúce bunkovú stenu nachádzajú priemyselné uplatnenie pri procesoch smerujúcich k uvoľneniu vnútrobunkového obsahu, napr. pri izolácii vnútrobunkových enzýmov kvasiniek. Široké uplatnenie majú tieto enzýmy aj v krmovinárstve ako prísada ku kŕmnomu droždíu (*Torulopsis*, *Saccharomyces*), zvyšujúca krmovinovú hodnotu droždíia.

Enzým laminarináza hydrolyzuje popri 1,3- β -glukanoch aj 1,3; 1,4- β -glukany, zatiaľ čo lichenáza (endo-1,3;

1,4- β -D-glukan glukanohydroláza E.C.3.2.1.73) je zodpovedná za hydrolyzu len 1,3; 1,4- β -glukanov (lichenan, glukan jačmeňa a pod.) [1, 2, 3]. Štruktúra 1,3- β -glukanu (laminaranu) a 1,3; 1,4- β -glukanu (lichenanu) je znázornená na obr. 1 a obr. 2.

Laminarinázová aktivita sa uplatňuje aj v slade pri degradácii jačmenného β -glukanu. Za účelom rozpracovania štandardnej a reprodukovateľnej metódy stanovenia laminarinázovej aktivity bol vyvinutý tabletový test S-test Laminarináza. Tableta tohto testu obsahuje chromolytický 1,3- β -D-glukan, mikrokryštalickú celulózu a všetky zložky potrebné k stanoveniu aktivity 1,3- β -glukanázy. Substrát použitý v tabľách je modifikovaný 1,3- β -glukan izolovaný z bunkových stien kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* [4].

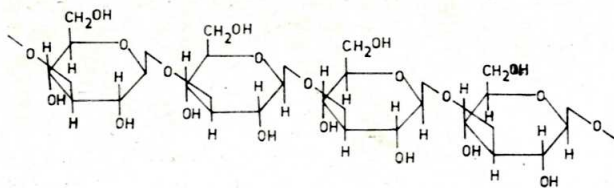
MATERIÁL A METÓDY

Enzýmy. Preparát laminarinázy z mikroskopických húb (*Penicillium* sp.) o aktivite 5 nkat.mg⁻¹ bol zakúpený u firmy Sigma (St. Louis, USA). Extrakcia enzýmov včítane laminarinázy bola urobená z komerčných sladov nasledovným postupom: predsušený slad sa pomelie na s'adovom mlynčeku Retch (1800 min⁻¹). Pomletý slad (2g) sa extrahuje do 15 ml fosfátového tlmivého roztoku (0,05 mol.l⁻¹, pH 4,5) na laboratórnej trepačke po dobu 30 minút. Suspenzia sa odstredí (3000 g, 5 min) a supernatant sa použije na stanovenie laminarinázovej aktivity.

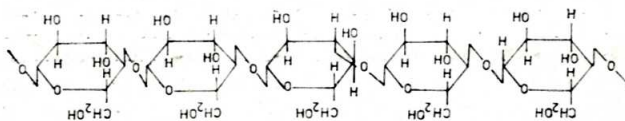
Tablety S-test Laminarináza boli pripravené v Ústave biotechnológie Slovenskej vysokej školy technickej, Bratislava, podľa [4] (výrobu a distribúciu zabezpečuje spolu s kontrolným enzýmovým preparátom o deklarovanej aktivite JZD Agrokombinát (Agrogen), Slušovice). Referenčnou metódou bola metóda stanovenia koncentrácie uvoľnených redukujúcich cukrov reakciou s kyselinou 3,5-dinitrosalicilovou (3,5-DNS) [5]. Substrátom pri tejto metóde bol laminaran izolovaný z bunkových stien kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* modifikovaný v reakcii s monochlóroctanom sodným za vzniku vodorozpustného karboxymetylaminaranu. Aktivita sa stanovovala pri 30 °C v prostredí fosfátového tlmivého roztoku (0,05 mol.l⁻¹, pH 4,5). Enzýmová reakcia s S-testom Laminarináza sa zastavila prídavkom zastavovacieho roztoku obsahujúceho 10 g uhlíčitanu sodného v 900 ml destilovanej vody a 100 ml acetónu [6].

VÝSLEDKY A DISKUSIA

K stanoveniu aktivity laminarinázy S-testom Laminarináza v sladových extraktoch a mikrobiálnych enzýmových preparátoch navrhujeme postup uvedený v tabuľke 1.



Obr. 1. Štruktúra 1,3- β -glukanu (laminaranu)



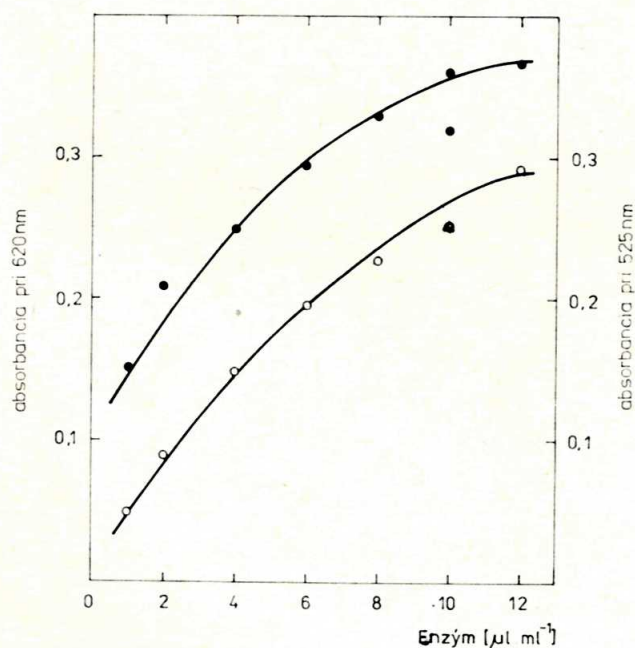
Obr. 2. Štruktúra 1,3; 1,4- β -glukanu (lichenanu)

Tabuľka 1. Postup stanovenia laminarinázovej aktivity použitím S-testu Laminarináza

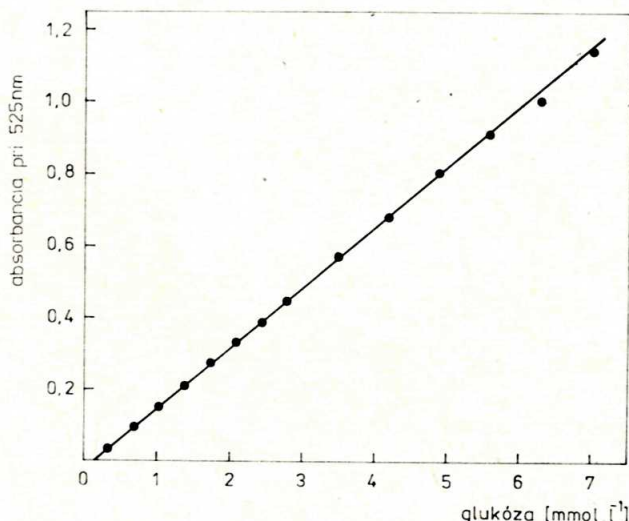
	Pokusná vzorka	Slepý pokus
	(ml)	(ml)
Fosfátový tlmivý roztok (0,05 mol. l ⁻¹ , pH 4,5)	0,5	0,5
Extrakt sladu alebo mikrobiálny enzým	0,5	—
Predinkubácia 5 min. pri 30 °C		
Pridavok jednej substrátovej tablety — inkubácia 60 min.		
Pridavok zastavovacieho roztoku	4,0	4,0
Extrakt sladu alebo mikrobiálny enzým	—	0,5
Centrifugácia (3000 g, 5 min.) alebo filtrácia, Whatmann No 1 alebo Filtrak No 595, Niederschlag, NDR		
Zmeranie absorbcie supernatantu alebo filtrátu oproti slepému pokusu pri 620 nm		
Prepočet aktivity enzýmu v slade pomocou kalibračnej krivky (μkat. kg ⁻¹)		

Postup pri stanovení S-testom Laminarináza je rovnaký ako pri stanovení S-testom Lichenáza [6] a tiež pri stanovení s S-testami používanými pri stanovení aktivít biotechnologicky významných hydrolytických enzýmov, čo je z hľadiska štandardizácie, normalizácie a ujednotenia metodík stanovenia aktivity enzýmov veľmi výhodné.

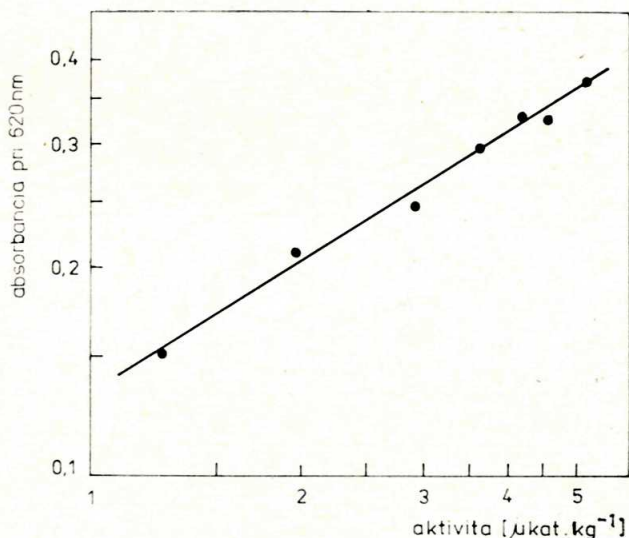
Paralelné stanovenie absorpcie, ktorú dáva enzýmový roztok laminarinázy (*Penicillium species*) pri metóde S-test Laminarináza a referenčnej metóde s použitím 3,5-DNS kyseliny je znázornené na obr. 3. Kalibračná krivka pre metódu s kyselinou 3,5-DNS na D-glukózu je znázornená na obr. 4. Z uvedených grafických závislostí bola zostrojená kalibračná krivka pre



Obr. 3. Vzťah medzi hodnotou absorpcie a objemom pridanej laminarinázy (*Penicillium sp.*) pri metóde S-test Laminarináza (●) a referenčnej metóde s použitím 3,5-DNS kyseliny (○)



Obr. 4. Kalibračná krivka pre stanovenie D-glukózy metódou s 3,5-DNS kyselinou



Obr. 5. Kalibračná krivka $a = f(A_{620})$ k stanoveniu aktivity laminarinázy z *Penicillium species* S-testom Laminarináza

prepočet absorpcie nameranej pri 620 nm na aktivitu (obr. 5). V logaritmickom usporiadaní kalibračnú krivku možno vyjadriť vzťahom

$$\log a = k_1 \log A + k_2$$

kde a je aktivita enzýmu (μkat. kg⁻¹) a A absorpcia pri 620 nm a konštanty k_1 a k_2 sú závislé od spôsobu modifikácie laminaranu. Pre substrát použitý v pokuse (obr. 5) $k_1 = 1,621$ a $k_2 = 1,423$. V tabuľke 2 sú zhrnuté výsledky stanovenia enzýmovej aktivity S-testom Laminarináza v sérii 8 opakovaných stanovení z toho istého zásobného enzýmového roztoku laminarinázy (*Penicillium species*). Hodnota variačného koeficienta vyjadrujúceho presnosť stanovenia je 4,3 %. V tabuľke 3 sú zhrnuté výsledky presnosti stanovenia aktivity enzýmu v 8 paralelných vzorkách extraktov, pripravených z jednej vzorky sladu. Variačný koeficient zohľadňujúci presnosť stanovenia aktivity enzýmu S-testom, ako aj presnosť prevedenia extrakcie sladu je 4,4 %. V tabuľke 4 sú uvedené výsledky stanovenia enzýmovej aktivity S-testom Laminarináza v 10 vzorkách sladov rôzneho pôvodu.

Pre kompletnú štandardizáciu pracovného postupu a medzilaboratórnu kontrolu presnosti spektrofotometrov je potrebné použiť aj S-test Farebný štandard s deklarovanými hodnotami absorpcií (620 nm) pri 3 úrovniach.

Tabuľka 2. Presnosť stanovenia laminarínázovej aktivity v sérii. Opakované stanovenie (8X) z toho istého zásobného roztoku laminarínázy (*Penicillium* sp., 2% roztok [obj])

Vzorka	Absorbancia pri 620 nm	Aktivita ($\mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$)	Priemerná hodnota (\bar{x})	Odhýľka od priemeru ($x_i - \bar{x}$)	Smerodajná odchýľka	Variačný koeficient (%)
1	0,258	97,0	101,4	-4,4	$\pm 0,13$	4,3
2	0,264	101,7		0,3		
3	0,259	97,0		-4,4		
4	0,272	106,5		5,1		
5	0,272	106,5		5,1		
6	0,260	99,0		-2,4		
7	0,272	106,5		5,1		
8	0,253	97,0		-4,4		

Hodnoty aktivít boli prepočítané z kriviek na obr. 3 a obr. 4, so zohľadneného zariadenia pracovného roztoku enzýmu a jeho obsahu v reakčnej zmesi, ako aj zohľadnením reakčného času (45 min) v prepočte na μkat za 1 sekundu.

Tabuľka 3. Presnosť stanovenia laminarínázovej aktivity v sérii. Opakované extrakcie (8X) enzýmu z toho istého sladu a následné stanovenie aktivity enzýmu (slad Trnava, diastatická mohutnosť 260 j. W. K., bielkoviny v sušine 11,1 %)

Vzorka	Absorbancia pri 620 nm	Aktivita ($\mu\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Priemerná hodnota (\bar{x})	Odhýľka od priemeru ($x_i - \bar{x}$)	Smerodajná odchýľka	Variačný koeficient (%)
1	0,254	2,90	2,76	0,14	$\pm 0,12$	4,4
2	0,244	2,70		-0,06		
3	0,254	2,90		0,14		
4	0,247	2,70		-0,06		
5	0,242	2,65		-0,11		
6	0,254	2,90		0,14		
7	0,245	2,70		-0,06		
8	0,240	2,60		-0,16		

Hodnoty aktivít boli odčítané z kalibračnej krivky na obr. 5.

Tabuľka 4. Štiepenie 1,3- β -D-glukanu enzýmovým komplexom sladu

Vzorka	Viskozita*) ($\text{mPa} \cdot \text{s}$)	Aktivita ($\mu\text{kat} \cdot \text{kg}^{-1}$)
slad A	1,54	2,60
slad B	1,54	2,45
slad C	1,54	2,25
slad D	—	2,25
slad E	1,70	2,40
slad F	1,58	2,15
slad G	1,59	2,20
slad H	1,57	2,15
slad I	1,55	2,30
slad J	1,59	2,30

*) Hodnoty viskozít podľa atestu vydaného Výskumným ústavom pivovarským a sladarským, pracovisko Brno

Literatura

- [1] BORRIS R., ZEMEK J.: Zbl. Bakt. II. Abt. **135**, 1980, 696.
- [2] BORRIS R., ZEMEK J.: Zbl. Bakt. II. Abt. **136**, 1981, s. 63.
- [3] BORRIS R., et al.: Zbl. Bakt. II. Abt. **135**, 1980, s. 435.
- [4] Čs. Pat. AO 237 424.
- [5] HLAVÁČEK I., KRÁLOVÁ B., MOŠTEK J.: Kvas. prům., **27**, 1979, s. 11.
- [6] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J., KUNIAK E.: Kvas. prům., **34**, 1988, s. 161.

Lektoroval Ing. Jaroslav Čepička, CSc.

Moncolová, V. - Zemek, J.: Stanovenie laminarínázovej aktivity za použitia chromolytického 1-3- β -D-glukanu v tabletovej forme. Kvas. prům., **35**, 1989, č. 5, s. 136—138.

Z predložených postupov a výsledkov vyplýva, že stanovenie aktivity laminarínázy tabletovým S-testom Laminarínáza predstavuje štandardný, jednoduchý a pritom presný postup použiteľný aj v priemyselných laboratóriách vybavených spektrofotometrami s detekciou vo viditeľnej oblasti spektra.

Монцолова, В. - Земек, И.: Определение ламинаринозой активности с применением хромолитического (1-3)- β -D-глюкана в форме таблеток. Квас. прум., **35**, 1989, № 5, стр. 136—138.

Из предложенных методов и результатов вытекает, что определение активности ламинариказы при помощи таблеточного S-теста Ламинариноза представляет собой стандартный, простой и одновременно точный способ, применимый и в промышленных лабораториях, оснащенных спектрофотометрами с детекцией в видимой области спектра.

Moncolová, V. - Zemek, J.: Determination of Laminarinase Activity Using Chromolytic (1-3)- β -D-Gluconate in the Form of Tablets. Kvas. prům., **35**, 1989, No. 5, pp 136—138.

The results obtained prove that the determination of the laminarinase activity with the tablet S-Test Laminarinase is standard, simple and precise procedure that can be used in any laboratory having spectrophotometer with a detector for visible range of the spectrum.

Moncolová, V. - Zemek, J.: Die Feststellung der Laminarinaseaktivität bei der Anwendung von chromolytischen (1-3)- β -D-Glukans in Tablettform. Kvas. prům., **35**, 1989, č. 5, s. 136—138.

Die angeführten Verfahren und Ergebnisse zeigen, dass die Feststellung der Laminarinase mit dem Tablett-S-Test Laminarinase ein einfaches und dabei exaktes Standardverfahren, das auch in Betriebslabors, die mit Spektrophotometern mit Detektion im sichtbaren Spektrumgebiet ausgestattet sind, darstellt.