

# Stanovenie celulázovej aktivity tabletovým S-testom Celuláza C<sub>x</sub>

Ing. VIERA MONCOLOVÁ, Ing. JIŘÍ ZEMEK, CSc., Bioefect, Bratislava

**Kľúčové slová:** *celuláza, spektrofotometer, tabletový S-test, aktivita*

579.663

## ÚVOD

Rôznorodosť celulolytických enzýmov a ich substrátov a nepoznanie substrátovej špecificity týchto enzýmov viedla v minulosti k vzniku početných analytických metód [1, 2]. Všetky celulolytické enzýmy štiepia  $\beta$ -1,4-glukozidické väzby a odlišujú sa

špecificitou k štruktúram obsahujúcim tieto väzby. Plesňové mikroorganizmy vytvárajú tri typy celulolytických enzýmov: endoglukanázu (1,4- $\beta$ -D-glukan-glukanohydroláza, EC 3.2.1.4), celobiohydrolázu (1,4- $\beta$ -D-glukan-celobiohydroláza, EC 3.2.1.91) a  $\beta$ -glukozidázu ( $\beta$ -D-glukozid-glukohydroláza, EC 3.2.1.21) [3]. Substrátová špecificita týchto enzýmov je uvedená v *tabuľke 1*.



Tabuľka 1. Hydrolýza rozličných substrátov celulolytickými enzýmami [3].

Enzým	Substrát				
	Kryštalická celulóza	Karboxymetylcelulóza	Amorfná celulóza	Celote traóza	Celobióza
endoglukanáza	—	+	+	+	—
celobiohydroláza	+	—	+	+	—
$\beta$ -glukozidáza	—	—	—	+	+

Okrem týchto enzýmov existujú zmienky o výskyte stopovej aktivity glukán-glukohydrolázy (1,4- $\beta$ -D-glukán-glukohydroláza, EC 3.2.1.74) [3]. Enzým odštiepuje glukózové zbytky z neredukujúceho konca celulóзовého reťazca. Účinkuje na celulózu nabobtnanú v kyseline fosforečnej, na celooligosacharidy a karboxymetylcelulózu (KMC). Celulolytický systém baktérií je podstatne jednoduchší ako u húb, baktérie produkujú len endoglukanázu a  $\beta$ -glukozidázu [3].

Metódy na stanovenie aktivít celulolytických enzýmov sú všeobecne založené na stanovení redukujúcich skupín sacharidov uvoľnených z natívnej formy celulózy alebo z jej modifikácií [4]. Avšak tieto metódy sú nešpecifické pre endo-1,4- $\beta$ -glukanázy, pretože interferujú s účinkom  $\beta$ -glukanáz pôsobiacich exo-mechanizmom [1,5]. Viskozimetrické [6–8] a nefelometrické [9, 10] metódy sú špecifickejšie, ale nevhodné pre stanovenie nerozpustných enzýmov a pre rutinnú prácu. V tabuľke 2

Tabuľka 2. Metódy stanovenia celulolytických aktivít

Aktivita	Substrát	Stanovená veličina
celková celulolytická	nerozp. kryštalická celulóza bavlna Avicel (mikrokryštalická celulóza) filtračný papier	obsah glukózy
endoglukanázová	karboxymetylcelulóza hydroxyetylcelulóza	zníženie viskozity obsah red. sacharidov
celobiohydrolázová	bavlna Avicel amorfná celulóza	obsah red. sacharidov
$\beta$ -glukozidázová	celobióza p-nitrofenyl- $\beta$ -D-glukozid	obsah glukózy obsah p-nitrofenolu

sú uvedené najviac používané metódy stanovenia aktivity celuláz [11].

Stanovenie celulolytických aktivít sa stáva jednoduchším zavedením chromolytických substrátov [12–19]. Metódy využívajúce tieto substráty sú založené na stanovení enzýmom uvoľnených rozpustných celulóзовých fragmentov, obsahujúcich kovalentne viazané farbivo. Východiskové substancie môžu byť buď rozpustné [12, 18, 19] alebo nerozpustné vo vode [13–17].

V predloženej práci sú prezentované výsledky s rutinným využívaním chromolytického tabletového S-testu Celuláza  $C_x$  pri stanovení endo-1,4- $\beta$ -glukanázy (celulázy  $C_x$ ).

## MATERIÁL A METÓDY

V práci bol použitý zmesný celulolytický preparát (produkčný kmeň *Trichoderma viride*), ktorý pod názvom „Celuláza“ vyvinul Výskumný ústav potravinárskeho priemyslu, Praha a vyrobený bol v bioprevádzke JRD Petrova Ves (okres Senica). Enzýmový preparát bol ponúknutý pre pivovarské účely na zlepšenie filtrovateľnosti piva. Preparát bol v práškovej forme a na stanovenie celulóзовej aktivity  $C_x$  bol pripravený 0,15 % roztok vo fosfátovom tlmivom roztoku (0,05 mol.l<sup>-1</sup>; pH 5,0).

Tabletový S-test Celuláza  $C_x$  bol dodaný na požiadanie z JZD Agrokombinátu (Agrogén), Slušovice a dodáva ho Bioeffect Lehnice. Tablety obsahovali ako chromolytický substrát hydroxyetylcelulózu. Enzýmová reakcia s S-testom Celuláza  $C_x$  sa zastavila prídavkom zastavovacieho roztoku o zložení 10 g uhličitanu sodného v 900 ml destilovanej vody a 100 ml acetónu. K metóde S-test bola použitá referenčná metóda s karboxymetylcelulózou (15 mg.ml<sup>-1</sup>) ako substrátom rozpusteným za tepla vo fosfátovom tlmivom roztoku (0,05 mol.l<sup>-1</sup>; pH 5,0). Reakčná zmes bola inkubovaná pri 30 °C počas 15 minút a uvoľnené redukujúce sacharidy boli stanovené reakciou s kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou (3,5-DNS) [20].

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na stanovenie aktivity celulázy  $C_x$  v preparáte „Celuláza“ S-testom Celuláza  $C_x$  sme použili nami vypracovaný postup uvedený v tabuľke 3.

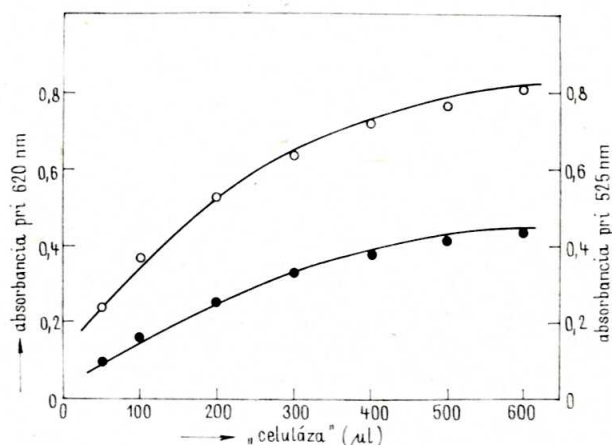
Tabuľka 3. Postup stanovenia aktivity celulázy  $C_x$  v preparáte „Celuláza“ S-testom Celuláza  $C_x$ .

Pokusná vzorka		Slepý pokus
	(ml)	(ml)
Fosfátový tlmivý roztok (0,05 mol.l <sup>-1</sup> , pH 5,0)	0,9	0,9
Roztok enzýmu (0,15 %)	0,1	—
Predinkubácia 5 min. pri 30 °C		
Prídavok jednej substrátovej tablety — inkubácia 30 min.		
Prídavok zastavovacieho roztoku	4,0	4,0
Roztok enzýmu (0,15 %)	—	0,1
Centrifugácia (3 000 g, 5 min.) alebo filtrácia, Whatman No.1 alebo Filtrak No.595		
Zmeranie absorbancie supernatantu alebo filtrátu oproti slepému pokusu pri 620 nm		
Prepočet aktivity enzýmového preparátu pomocou kalibračnej krivky ( $\mu$ kat.g <sup>-1</sup> )		

Uvedený postup sme zopakovali pre sedem rôznych prídavkov pôvodného enzýmového roztoku tak, aby výsledný objem bol 1 ml. Paralelne boli vykonané pokusy referenčnou metódou — pozri Materiál a metódy, s takými istými riedeniami pôvodného enzýmového roztoku. Vzťah medzi hod-

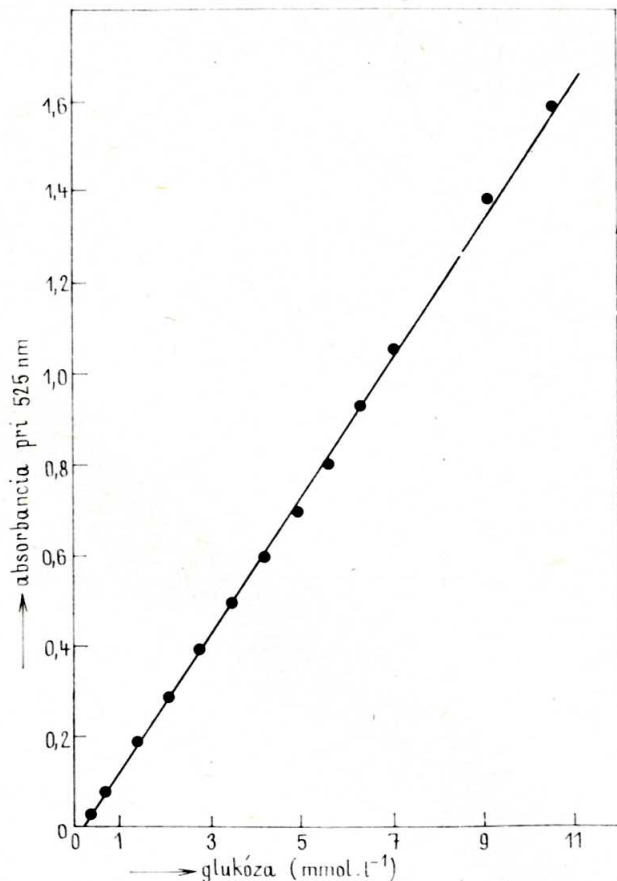


notou nameranej absorbančie a objemom pridaného enzýmového preparátu „Celuláza“ pri metóde S-test Celuláza  $C_x$  a pri referenčnej metóde s použitím 3,5-DNS kyseliny je uvedený na obr. 1. Pre

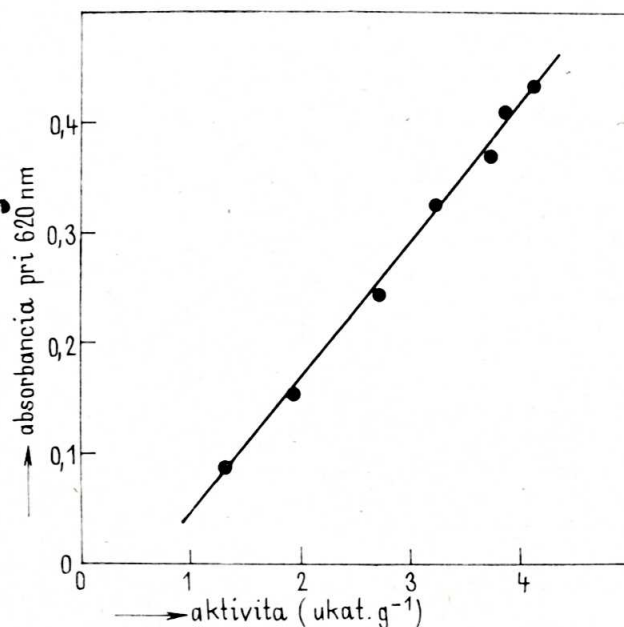


Obr. 1. Vzťah medzi hodnotou absorbančie a objemom pridaného enzýmového preparátu „Celuláza“ (0,15% roztok) pri metóde S-test Celuláza  $C_x$  (●) a pri referenčnej metóde (○).

referenčnú metódu bola zostrojená kalibračná krivka na D-glukózu a znázornená je na obr. 2. Použitím tejto kalibračnej krivky boli hodnoty absorban-



Obr. 2. Kalibračná krivka pre referenčnú metódu s 3,5-DNS kyselinou na D-glukózu.



Obr. 3. Kalibračná krivka  $a = f(A_{620})$  na stanovenie aktivity celulózy  $C_x$  v preparáte „Celuláza“ (z *Trichoderma viride*) S-testom Celuláza  $C_x$ .

cie namerané referenčnou metódou premenené na hodnoty uvoľnených redukujúcich sacharidov a tieto boli ďalej prepočítané (zahrnutím zriedovacích pomerov a reakčného času) na hodnoty enzýmových aktivít. Vypočítané hodnoty enzýmových aktivít v  $\mu\text{kat.g}^{-1}$  boli vynesené do grafu oproti zodpovedajúcim hodnotám absorbančie nameranej pri 620 nm metódou S-test Celuláza  $C_x$ , čím bola zostrojená kalibračná krivka pre prepočet absorbančie na aktivitu celulózy  $C_x$  (obr. 3). Túto kalibračnú krivku používa výrobca v ďalšom ako súčasť tabletového testu.

Kalibračnú krivku na obr. 3 možno vyjadriť vzťahom:

$$a = k_1 A + k_2,$$

kde  $a$  je aktivita celulózy  $C_x$  ( $\mu\text{kat.g}^{-1}$ ) a  $A$  je absorbančie pri 620 nm,  $k_1$  a  $k_2$  sú konštanty závislé od spôsobu modifikácie substrátu. Pre substrát použitý v tabletách S-test Celuláza  $C_x$  v našom pokuse (obr. 3)  $k_1 = 7,936$  a  $k_2 = 0,651$ .

V tabuľke 4 sú zhrnuté výsledky presnosti stanovenia

Tabuľka 4. Presnosť stanovenia aktivity celulózy  $C_x$  v sérii S-testom Celuláza  $C_x$ . Opakované stanovenie (10) z toho istého roztoku enzýmového preparátu „Celuláza“.

Vzorka	Absorbančie pri 620 nm	Aktivita ( $\mu\text{kat.g}^{-1}$ )	Priemer. hodnota	Odhýlka od priemeru	Smerodajná odhýlka	Variačný koeficient (%)
1	0,225	2,45	2,33	0,12	$\pm 0,08$	3,6
2	0,218	2,40		0,07		
3	0,216	2,35		0,02		
4	0,203	2,25		-0,08		
5	0,222	2,40		0,07		
6	0,199	2,25		-0,08		
7	0,203	2,25		-0,08		
8	0,209	2,30		-0,03		
9	0,228	2,45		0,12		
10	0,199	2,25		-0,08		

Hodnoty aktivít boli odčítané z kalibračnej krivky (obr. 3)



venia aktivity celulózy  $C_x$  v preparáte „Celulóza“ S-testom Celulóza  $C_x$ . Pre aktivitu celulózy  $C_x$  2,33  $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$  je hodnota variačného koeficientu  $v_k = 3,6 \%$ .

Pre kompletnú štandardizáciu pracovného postupu a medzilaboratórnu kontrolu presnosti spektrofotometrov je potrebné použiť aj S-test Farebný štandard a enzýmový štandard celulózy  $C_x$  v tabletovej forme s deklarovanou aktivitou.

## ZÁVER

Z predložených postupov vyplýva, že stanovenie aktivity celulózy  $C_x$  tabletovým S-testom Celulóza  $C_x$  je rovnaké ako stanovenie aktivít iných biotechnologicky významných hydrolytických enzýmov publikovaných v predchádzajúcich prácach [21 až 25], čo je z hľadiska štandardizácie a normalizácie metodík stanovenia aktivity enzýmov veľmi výhodné. Metódy sú výhodné aj pre svoju jednoduchosť a rýchlosť analýzy väčšej série vzoriek.

## LITERATÚRA

- [1] MANDELS M., ANDREOTTI R., ROCHE C. In: Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 6 (GADEN E. L., MANDELS M. H., REESE E. T., SPANO L. A., eds), Wiley, 1976, New York, s. 21
- [2] ENARI T.-M., MARKKANEN P. In: Advances in Biochemical Engineering (CHOSE T.-K., FIECHTER A., BLAKESBROUGH N., eds), 5, Springer Verlag, Berlin-New York, 1977, s. 3
- [3] ENARI T.-C.: Microbial Cellulases, In: Microbial Enzymes and Biotechnology (FOGARTY W.-M., ed.), Applied Science Publishers Ltd, London - New York, 1983, s. 156
- [4] ZEMEK, J., PAVLICOVÁ Z., KOVÁŘ, J., KUNIAK, L.: Determination of endo-1,4- $\beta$ -glucanase and the total cellulolytic activity with derivatized chromolytic cellulose, In: Enzyme Technologies, Progress in Biotechnology (BLAŽEJ A., ZEMEK J., eds), 4, Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, 1987, s. 469
- [5] BAILEY M.-J., NEVALAINEN K.-H.: Enzyme Microbial Technology, 3, 1981, s. 143
- [6] ALMIN K.-E., ERIKSSON K.-E.: Biochem. Biophys. Acta, 130, 1967, s. 238
- [7] ALMIN K.-E., ERIKSSON K.-E., PETERSSON B.: Eur. J. Biochem., 51, 1975, s. 207
- [8] ENARI T.-M., MARKKANEN P. In: Advances in Biochemical Engineering (CHOSE T.-K., FIECHTER A., BLAKESBROUGH N., eds), 5, Springer Verlag, Berlin - New York, 1977, s. 1
- [9] GORBACHEVA I. V., RODIONOVA N. A.: Biochem. Biophys. Acta, 484, 1977, s. 79
- [10] NUMMI M., FOX P.-C., NIKU-PAAVOLA, M.-L., ENARI T.-M.: Anal. Biochem., 116, 1981, s. 133
- [11] ENARI T.-M.: Microbial Cellulases, In: Microbial Enzymes and Biotechnology (FOGARTY W.-M., ed.), Appl. Sci. Publ. Ltd, London - New York, 1983, s. 187
- [12] McCLEARY B.-V.: Carbohydr. Res., 86, 1980, s. 97
- [13] POINCELOT R.-P., DAY P.-R.: Appl. Microbiol., 22, 1972, s. 875
- [14] HUANG J. S., TANG J.: Anal. Biochem., 73, 1976, s. 369
- [15] LEISOLA M., LINKO M.: Anal. Biochem., 70, 1976, s. 592
- [16] NG T. K., ZEIKUS J. G.: Anal. Biochem., 103, 1980, s. 42
- [17] Pat., CS, AO 192 202
- [18] Pat., CS, AO 237 101
- [19] BIELY P., MISLOVICOVÁ D., TOMAN R.: Anal. Biochem., 144, 1985, s. 142
- [20] HLAVÁČEK I., KRÁLOVÁ B., MOŠTEK J.: Kvas. prům., 25, 1979, s. 241
- [21] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J., KUNIAK L.: Kvas. prům., 34, 1988, s. 161
- [22] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J., KUNIAK L.: Kvas. prům., 34, 1988, s. 290
- [23] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J.: Kvas. prům., 35, 1989, s. 136
- [24] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J.: Kvas. prům., 35, 1989, s. 229
- [25] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J.: Kvas. prům., 36, 1990, s. 289

Lektoroval Ing. Jan Masák, CSc.

**Moncoľová, V. - Zemek, J.: Stanovenie celulózovej aktivity tabletovým S-testom Celulóza  $C_x$ .** Kvas. prům., 37, 1991, č. 2, s. 37—40.

V práci sú prezentované výsledky s rutinným využitím chromolytického tabletového S-testu Celulóza  $C_x$  pri stanovení celulózovej aktivity  $C_x$  v enzýmovom preparáte „Celulóza“ (produkčný kmeň *Trichoderma viride*, výrobca JRD Petrova Ves).

K metóde S-test bola použitá referenčná metóda s karboxymetylcelulózou ako substrátom, ktorého enzýmovou hydrolýzou vzniknuté redukujúce sacharidy boli stanovené reakciou s kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou.

Pre aktivitu celulózy  $C_x$  2,33  $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$  bola hodnota variačného koeficienta  $v_k = 3,6 \%$ .

**Монцольова, В. - Земек, И.: Определение целюлазной активности таблеточным S-тестом Целюлаза  $C_x$ .** Квас. прум. 37, 1991, № 2, стр. 37—40.

В работе представлены результаты рутинного использования хромолитического таблеточного S-теста Целюлаза  $C_x$  в ферментном препарате »Целюлаза« (штамм *Trichoderma viride*, производитель ЕСК Петрова Вес).

Добавочно к этому испытанию был применен референтный метод с карбоксиметилцеллюлозой в качестве субстрата, энимным гидролизом его возникшие восстанавливающие сахарады были определены путем реакции с 3,5-динитросалициловой кислотой.

Для активности целюлазы  $C_x$  2,33  $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$  величина вариационного коэффицента составляла  $v_k = 3,6 \%$ .

**Moncoľová, V. - Zemek, J.: Determination of Cellulase Activity Using the Tablet S-Test Cellulase  $C_x$ .** Kvas. prům., 37, 1991, No. 2, pp 37—40.

The tablet S-Test Cellulase  $C_x$  was routinely used for the determination of cellulase activity  $C_x$  in the enzyme prepare „Cellulase“ [production strain *Trichoderma viride*] from Cooperation Farm Petrova Ves. In the comparative method carboxymethyl cellulose, as the substrate, was enzymatically hydrolyzed and reduced saccharides formed were determined by the reaction with 3,5-dinitro salicylic acid. For the cellulase activity  $C_x$  of 2,33  $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$  the value of a variation coefficient was  $v_k = 3.6 \%$ .

**Moncoľová, V. - Zemek, J.: Bestimmung der Cellulase-Aktivität mittels Tabletten-S-Test Cellulase  $C_x$ .** Kvas. prům., 37, 1991, Nr. 2, S. 37—40.

In der Mitteilung präsentieren die Autoren die Ergebnisse mit der Routine-Applikation des chromolytischen Tabletten-S-Tests Cellulase  $C_x$  zur Bestimmung der Cellulase-Aktivität  $C_x$  im Enzym-Präparat „Cellulase“ [Produktionsstamm *Trichoderma viride*, Hersteller Einheitliche landwirtschaftliche Genossenschaft Petrova Ves].

Zu der S-Test-Methode wurde die Referenzmethode mit Karboxymethylcellulose als Substrat angewandt, dessen durch Enzymhydrolyse entstandenen reduzierten Saccharide mittels Reaktion mit 3,5-Dinitrosalicylsäure bestimmt wurden.

Für die Aktivität der Cellulase  $C_x$  2,33  $\mu\text{kat} \cdot \text{g}^{-1}$  war der Wert des Variationskoeffizienten  $v_k = 3,6 \%$ .