

Stabilizácia enzýmov ako vnútorných štandardov v biotechnologickej enzýmovej analýze

I. eS-test Enzýmový štandard sladovej α -amylázy

Ing. Viera MONCOLOVÁ, Ing. Jiří ZEMEK, CSc., Bioeffect, 930 37 Lehnice

Kľúčové slová: sladová α -amyláza, eS-test Enzýmový štandard, spektrofotometer, aktivita, tabletový eS-test 579 663

ÚVOD

Pre unifikáciu a kompletnú štandardizáciu metodík stanovenia aktivity enzýmov pomocou chromolytických substrátov v tabletovej forme je potrebný eS-test Farebný štandard - pre medzilaboratórnu kontrolu presnosti spektrofotometrov a eS-test Enzýmový štandard pre kontrolu funkčnosti eS-testov. Z uvedeného vyplýva požiadavka prípravy stabilných enzýmových štandardov s deklarovanou enzýmovou aktivitou.

Pre stabilizáciu enzýmov a enzýmových systémov možno zvoliť jednu z nasledovných metód:

1. Izoláciu enzýmov alebo enzýmových komplexov z mikroorganizmov nachádzajúcich sa prirodzene v teplotne extrémnych podmienkach [1]
2. Metódami génového inžinierstva zaviesť DNA z termofilného mikroorganizmu do mezofilného, v dôsledku čoho tento začne syntetizovať termofilné proteíny [2]
3. Stabilizáciu mezofilných enzýmov
 - a) Imobilizáciou enzýmov na nosiči
 - b) Pozmenením molekulárnej štruktúry proteínu nízkomolekulovými látkami

Množstvo literárnych údajov sa týka stabilizácie α -amylázy v prítomnosti detergentov [3] a to tak pre účely prípravy biologicky aktívnych pracích prostriedkov [4], alebo prípravkov na umývanie riadu [5,6,7,8] často v kombinácii s proteolytickými enzýmami [9] alebo lipázami. Súčasťou uvedených preparátov so stabilizačným účinkom sú popri vápenatých soliach [10] aj alkalomíny a niektoré organické kyseliny [11].

Nakol'ko fyzikálne metódy stabilizácie sú vo svojich možnostiach obmedzené, celý rad prác sa orientuje na využívanie technológií s rekombinantnou DNA [12,13,14,15,16,17,18]. Detailnejšie štúdie v tomto smere umožnili zostavenie kompletnej nukleotidovej sekvencie génu termofilnej α -amylázy [19].

Špeciálnym smerom v stabilizácii enzýmových preparátov je príprava stabilných enzýmových štandardov s deklarovanou enzýmovou aktivitou. V prípade sladovej α -amylázy ako typicky mezofilného enzýmu, pre účely štandardizácie a unifikácie analytického postupu sme volili metódy založené na imobilizácii enzýmov na nosiči fyzikálnym spôsobom. Tento spôsob sa realizoval formou zakotvenia sladovej α -amylázy na povrchu špeciálne upraveného sieťovaného glykoproteínu s vlastnosťami vhodnými tak pre gélovú chromatografiu ako aj pre galenické účely, teda simulácia endoplazmatického retikula chemosyntetickým, štruktúrne analogickým produktom.

Tento spôsob stabilizácie sa porovnával s použitím sieťovaného glykogénu, analóga afinanta α -amylázy, schopným na fázovom rozhraní tento enzým stabilizovať pri skladovaní. Stabilizačný účinok glykoproteínu modifikovaného v reakcii sieťovania, resp. povrchu nerozpustného glykogénu sa sledoval aj v závislosti na tepelnej expozícii.

MATERIÁL A METÓDY

Príprava extraktu sladovej amylázy v práškovej forme: 3 g jačmenného a sladového šrotu (sladový mlynček Retsch, 1800.min⁻¹) sa extrahuje v 15 ml 20 % vodného roztoku etanolu na laboratórnej trepačke počas 30 minút [20]. Suspenzia sa scentrifuguje (3000 g, 10 min) a supernatant se zráža 3,5násobným objemom etanolu denaturovaného 1 % (objemovým) benzínu počas 24 hodín pri teplote 20 °C. Vytvorený precipitát je oddelený centrifugáciou, potom dvakrát premytý acetónom a voľne vysušený pri laboratórnej teplote.

Enzýmový štandard sladovej α -amylázy v tabletovej forme bol pripravený zakotvením sladovej amylázy (prípravenej podľa predchádzajúceho postupu) na povrchu sieťovaním modifikovaného kolagénu a jeho nasledovným adjustovaním v procese suchého tabletovania v prítomnosti mikrokryštalickej celulózy [21,22].

STANOVENIE AKTIVITY ENZÝMOVÉHO ŠTANDARDU SLADOVEJ α -AMYLÁZY

Jedna tableta Enzýmového štandardu sa rozpustí v 2 ml destilovanej vody a za občasného premiešania sa nechá 15 minút stáť. Po tomto čase sa suspenzia scentrifuguje (3000 g, 5 min) a supernatant obsahujúci α -amylázovú aktivitu sa použije na stanovenie aktivity eS-testom Amyláza (výrobok našej firmy) nasledovným postupom: do centrifugačných skúmaviek sa pipetuje 1 ml fosfátového tlmivého roztoku (0,05 mol.l⁻¹, pH = 5,0) a 0,1 ml supernatantu a nechá sa temperovať 5 min pri 30 °C. Potom sa pinzetou pridá jedna tableta eS-test Amyláza a nechá sa inkubovať pri 30 °C 15 minút bez miešania. Po 15 minútach sa reakcia zastaví prídavkom 4 ml zastavovacieho roztoku (10 g uhličitanu sodného v 900 ml vody a 100 ml acetónu), pričom sa roztok v skúmavke dobre premieša. Po 5 minútach sa roztok scentrifuguje (3000 g, 5 min) a zmeria sa absorbancia číreho supernatantu pri 620 nm oproti slepému pokusu (namiesto enzýmového roztoku sa použije tlmivý roztok).

Z nameranej absorbancie sa vyjadří aktivita sladovej α -amylázy použitím kalibračnej krivky $a = f(A_{620})$, ktorej konštrukciu pre sladovú α -amylázu sme uviedli v práci [23] a ktorej matematickým vyjadrením je logaritmická rovnica: $\log a = k_1 \log A + k_2$, pričom a je aktivita enzýmu ($\mu\text{kat.kg}^{-1}$), A je absorbancia pri 620 nm a konštanty $k_1 = 0,892$ a $k_2 = 2,799$ sú závislé od spôsobu modifikácie škrobového substrátu.

IMOBILIZÁCIA SLADOVEJ α -AMYLÁZY NA SIEŤOVOM GLYKOGÉNE

Sieťovaný glykogén s deficientnými substrátovými a afinantnými vlastnosťami pre sladovú α -amylázu bol pripravený podľa [24]. Imobilizácia enzýmu na nerozpustný glykogén

bola vykonaná nasledovne: K 500 mg glykogénu bol pridaný roztok sladovej α -amylázy (aktivita $928 \mu\text{kat.kg}^{-1}$) v objeme zodpovedajúcom polovici napúšacieho objemu glykogénu, čím bola vytvorená hustá suspenzia. Po dôkladnom premiešaní bola suspenzia rozotretá do tenkej vrstvy a vysušená pri laboratórnej teplote.

UVOLNENIE SLADOVEJ α -AMYLÁZY Z POVRCHU SIEŤOVANÉHO GLYKOGÉNU

Sladová α -amyláza imobilizovaná na sieťovanom glykogéne bola uvoľnená suspendovaním 50 mg navážky suspenzie do 1 ml fosfátového roztoku ($0,01 \text{ mol.l}^{-1}$, pH = 5,0) počas 10 minút pri 30°C . Do roztoku s uvoľnenou α -amylázou sa pridala jedna substrátová tableta eS-test Amyláza a stanovila sa enzýmová aktivita rovnakým postupom ako bolo vyššie uvedené.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Presnosť tabliet Enzýmového štandardu sladovej α -amylázy sme testovali jednak vzhľadom k ich hmotnosti a jednak k presnosti stanovenia aktivity, ktorá po rozpustení tablety sa uvoľní do roztoku. Výsledky sú uvedené v tabuľke 1, resp. 2. Hmotnosť v 14 náhodne vybraných tabletách Enzýmového štandardu bola určená s variačným koeficientom $v = 1,92\%$. Obidve hodnoty variačných koeficientov sú pre Enzýmový štandard vyhovujúce.

Tabuľka 1. Presnosť enzýmových tabliet vzhľadom k ich hmotnosti

Číslo	Hmotnosť	Priemerná hodnota	Odchylka od priemeru	Smerodajná odchylka	Variačný koeficient (%)
1	0,0974		-0,0033		
2	0,1033		0,0026		
3	0,1016		0,0009		
4	0,1028		0,0021		
5	0,0979		-0,0028		
6	0,1016		0,0009		
7	0,1004	0,1007	-0,0003	$\pm 1,8 \cdot 10^{-3}$	1,80
8	0,1023		0,0016		
9	0,1005		-0,0002		
10	0,1007		0,0000		
11	0,0979		-0,0028		
12	0,1010		0,0003		
13	0,1015		0,0008		
14	0,1007		0,0000		

V ďalšej sérii pokosov sme testovali stabilitu tabletového Enzýmového štandardu za podmienok, ktoré umožnili zrýchlenie testu stability. Tablety sme exponovali pri teplote 40, 60, 80 a 100°C po dobu 24 hodín a následne sme v nich stanovili enzýmovú aktivitu. Namerané hodnoty enzýmových aktivít sú uvedené v tabuľke 3. Z výsledkov tohto testu možno predpokladať stabilitu Enzýmového štandardu pri odporúčaných skladovacích podmienkach. Pri teplote skladovania 4 až 8°C po dobu 2 rokov diferencia v stanovenej hodnote aktivity Enzýmového štandardu nie je väčšia, ako je presnosť stanovenia aktivity

(tab.3). Výsledky zrýchleného testu stability ako aj 2ročného skladovania potvrdzujú dobrú stabilitu testovaného Enzýmového štandardu sladovej α -amylázy.

Tabuľka 2. Presnosť stanovenia aktivity Enzýmového štandardu sladovej α -amylázy v sérii. Opakované stanovenie v 13 enzýmových tabletách určené metódou eS-test Amyláza

Číslo	Absorbancia pri 620 nm	Aktivita ($\mu\text{kat.kg}^{-1}$)	Priemerná hodnota	Odchylka od priemeru	Smerodajná odchylka	Variačný koeficient (%)
1	0,1906	143,5		3,0		
2	0,1805	136,7		-3,8		
3	0,1804	136,6		-3,9		
4	0,1810	137,0		-3,5		
5	0,1858	140,0		-0,2		
6	0,1836	138,8	140,5	-1,7	$\pm 2,7$	1,92
7	0,1882	141,9		1,4		
8	0,1877	141,6		1,1		
9	0,1887	142,2		1,7		
10	0,1863	140,6		0,1		
11	0,1925	144,8		4,3		
12	0,1901	143,2		2,7		
13	0,1836	138,8		-1,7		

Hodnoty aktivít boli odčítané z kalibračnej krivky, ktorej matematickým vyjadrením je logaritmickej rovnica uvedená v kapitole Materiál a metódy.

Tabuľka 3. Namerané hodnoty aktivít v tabletách Enzýmového štandardu sladovej α -amylázy exponovaných po dobu 24 hodín pri rôznych teplotách. α -amylázová aktivita bola stanovená metódou eS-test Amyláza (na stanovenie bolo vzaté 0,2 ml supernatantu z rozpustenej enzýmovej tablety)

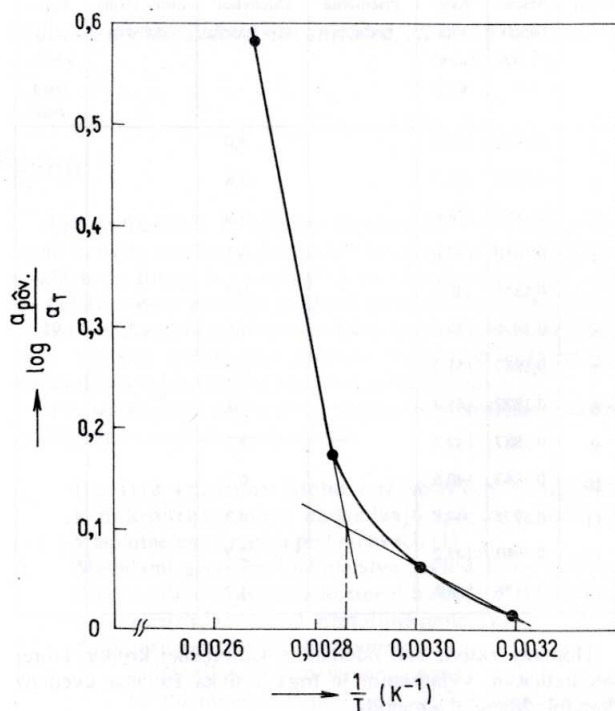
Expozícia teplota ($^\circ\text{C}$)	Aktivita ($\mu\text{kat.kg}^{-1}$)	Percento z pôvodnej aktivity
-	269,3*	100
40	260,5	96,7
60	233,5	86,7
80	180,2	66,9
100	70,1	26,0

Pri expozícii 2 roky pri teplote 4°C aktivita poklesla z pôvodnej hodnoty $269,3 \mu\text{kat.kg}^{-1}$ na $266,2 \mu\text{kat.kg}^{-1}$.

* Pôvodná aktivita stanovená v tabletách Enzýmového štandardu

Na obr. 1 je graficky znázornený vplyv teploty na inaktiváciu Enzýmového štandardu vyjadrený podľa Arrheniovej rovnice. Vynesením hodnôt $\log a_{\text{pov}} / a_T$, kde a_{pov} je pôvodná aktivita Enzýmového štandardu a a_T je aktivita Enzýmového štandardu po predchádzajúcej expozícii tablety pri príslušnej teplote oproti príslušným recipročným hodnotám expozičnej teploty v Kelvinových stupňoch. Získali sme krivku namiesto očakávanej

priamky. Nami získanú krivku možno rozložiť na dve priamky, ktorých dve rôzne smernice udávajú dve rôzne inaktivačné konštanty, čo je charakteristické pre sladovú α -amylázu ako mezofilný enzým. Pre teplotu 40 a 60 °C bola graficky vypočítaná hodnota inaktivačnej konštanty -247,6 deg a pre teplotu 80 a 100 °C bola hodnota inaktivačnej konštanty -2 698,7 deg. Z priesečníka inaktivačných konštánt Enzýmového štandardu sme zistili, že v oblasti teploty 349,6 °K, tj. 76,5 °C nastáva zmena v kinetike inaktívácie.



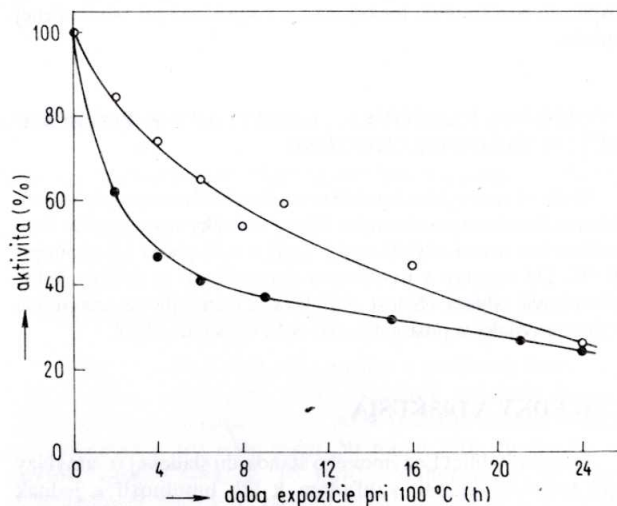
Obr.1. Teplotná závislosť inaktívácie Enzýmového štandardu sladovej α -amylázy v tabletovanej forme. Expozičný čas 24 hodín. α -amylázová aktivita bola určená metódou S-test Amyláza.

V ďalšej sérii pokusov sme testovali stabilizačný účinok sieťovaním modifikovaného kolagénu simulujúceho endoplazmatické retikulum, na princípe ktorom boli konštruované tablety Enzýmového štandardu a porovnávali so stabilizačným účinkom sieťovaného glykogénu, na ktorý sme imobilizovali sladovú α -amylázu. Stabilizačný účinok sa v oboch prípadoch sledoval v závislosti na čase pri teplotnej expozícii 100 °C a s následným stanovením aktivity.

Na obr. 2 je znázornený časový priebeh inaktívácie sladovej α -amylázy stabilizovanej dvoma rôznymi uvedenými spôsobmi. Z grafického zobrazenia vidieť, že inaktívacia Enzýmového štandardu sladovej α -amylázy stabilizovanej na sieťovanom kolagéne má pozvoľnejší priebeh, hlavne prvých 6 hodín expozície tablet, ako je priebeh inaktívácie sladovej α -amylázy imobilizovanej na sieťovanom glykogéne. Výsledky tohto, ako aj predchádzajúceho testu svedčia o vyhovujúcej stabilite Enzýmového štandardu a jeho vhodnosti použitia pre kontrolu funkčnosti eS-testu Amyláza.

V prípade sieťovaného kolagénu stabilizačný efekt vysvetľujeme ochranným účinkom proteínu, stabilizovaného vďaka vyšším teplotám v reakcii sieťovania. U sieťovaného glykogénu predpokladáme prioritne účinok analóga substrátu (afinantu) na konformáciu enzýmu, stabilizovanú pre vyššie teploty.

Na základe vykonaných pokusov deklarujeme aktivitu Enzýmového štandardu sladovej α -amylázy stanovenú metódou eS-test Amyláza s použitím substrátových tablet.



Obr.2. Časová závislosť inaktívácie sladovej α -amylázy chránenej na sieťovanom kolagéne simulujúcom endoplazmatické retikulum (o) a na sieťovanom glykogéne (*). Expozičná teplota 100 °C.

Pri dlhodobom skladovaní (2 roky) tablet Enzýmového štandardu sladovej α -amylázy pri teplote 4 až 8 °C nebola zistená diferencia v stanovenej aktivite väčšia ako je presnosť stanovenia aktivity eS-testom Amyláza (tabuľka 3).

Autori predpokladajú, že uvedený spôsob prípravy Enzýmového štandardu sladovej α -amylázy v tabletovanej forme bude použiteľný aj pre prípravu tabletových štandardov ďalších biotechnologických dôležitých enzýmov.

ZÁVER

Výsledky vykonaných testovacích pokusov potvrdili, že spôsob prípravy Enzýmového štandardu sladovej α -amylázy zakotvením enzýmu na povrchu sieťovaného kolagénu simulujúceho endoplazmatické retikulum sa ukázal ako vhodný pre stabilizáciu enzýmu a použiteľný pre jeho tabletovú formu.

LITERATÚRA

- [1] OSHIMA, T.: Enzyme Engineering, Vol. 4, Plenum Press New York, London, 1978, s.41
- [2] AMELUNXEN, R.E., MURDOCK, A.L.: Microbial Life at Extreme Environment, Academic Press, London, 1978
- [3] Pat. DE 3 330 323
- [4] Pat. US 4 421 664
- [5] Pat. NSR 3 428 848
- [6] Pat. NSR 3 428 834
- [7] Pat. NSR 3 428 833
- [8] Pat. WO 8 404 324
- [9] Pat. DE 3 344 097
- [10] Pat. JP 7 028 197
- [11] Pat. US 4 243 546
- [12] Pat. FR 2 533 583
- [13] Pat. FR 2 537 602
- [14] Pat. EP 124 076

- [15] Pat. US 4 493 893
- [16] Pat. EP 108 301
- [17] TSUKAGOSHI, N. et al.: Mol. Gen. Genet., **193**, 1984, s. 58
- [18] Pat. FR 2 533 583
- [19] IHARA, H., TSUKAGOSHI, N., UDAKA, S.: J. Biochem., **98**, 1985, s. 95
- [20] HLA VÁČEK, J., KRÁLOVÁ, B., MOŠTEK, J.: Kvas. prům., **25**, 1979, s. 241
- [21] AO, 192 210, CS
- [22] ZEMEK, J., KUNIAK, L., YOURKSHTOVICH, T. L.: Makromol. Chem. Suppl., **9**, 1985, s. 227
- [23] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J., KUNIAK, L.: Kvas. prům., **34**, 1988, s. 290
- [24] ZEMEK, J., BAUER, Š., KUNIAK, L.: Biopolymers, **18**, 1979, s. 2 135

Lektoroval Ing. J. Masák, CSc.

MONCOLOVÁ, V. - ZEMEK, J.: Stabilizácia enzýmov ako vnútorných štandardov v biotechnologickej enzýmovej analýze. I. eS-Test Enzýmový štandard sladovej α -amylázy. Kvas. prům., **37**, 1992, č. 9, s. 262 - 265

V práci sú prezentované výsledky testovania tabletového eS-testu Enzýmového štandardu sladovej α -amylázy, pripraveného zakotvením sladovej α -amylázy na povrchu sieťovaním modifikovaného kolagénu, vzhľadom k hmotnosti tabliet (variačný koeficient $v=1,80\%$) a vzhľadom k presnosti stanovenia aktivity (variačný koeficient $v=1,92\%$).

Zrýchleným testom za extrémnych podmienok bola testovaná stabilita Enzýmového štandardu (v závislosti od teploty i od času expozície tabliet). Pri teplote skladovania 4 až 8 °C po dobu 2 rokov úbytok v stanovenej hodnote aktivity Enzýmového štandardu nie je väčší ako je presnosť stanovenie aktivity eS-testom Amyláza.

Монцолова, В. - Земек, И.: Стабилизация энзимов как внутренних стандартов в биотехнологическом энзимном анализе. 1. eC-тест Энзимный стандарт солодовой амилазы. Квас. прум., **38**, 1992, № 9, стр. 262 - 265

В работе представлены результаты испытания таблеточного eC-теста Энзимного стандарта солодовой α -амилазы, приготовленного закреплением солодовой α -амилазы на

поверхности модифицированного коллагена в отношении к массе таблеток (вариационный коэффициент = 1,80 %) и к точности определения активности (вариационный коэффициент = 1,92 %).

Быстродействующим тестом при экстремных условиях испытывалась стабильность Энзимного стандарта (в зависимости от температуры и от времени проявления таблеток). При температуре хранения 4 - 8 °C в продолжение 2 лет убыток в установленной величине активности Энзимного стандарта не больше как точность определения активности °C-тестом Амилаза.

MONCOLOVÁ, V. - ZEMEK, J.: Enzyme Stabilizations Used as Internal Standards in Enzyme analysis for Biotechnology. I. eS-Test Enzyme Standard of Malt α -Amylase. Kvas. prům., **38**, 1992, No. 9, pp 262 - 265

Tablet eS-Test enzyme standard of malt α -amylase was prepared by an immobilization of malt α -amylase on a surface of modified collagen with respect to the tablet weight (variation coefficient $v = 1.80\%$) and to the accuracy of the activity determination (variation coefficient $v = 1.92\%$). The stability of enzyme standard (as a function of temperature and time exposure) was tested by an accelerated test under extreme conditions. The decrease in the activity of enzyme standard after 2 years of storage at the temperature of 4 °C is lower than the accuracy of the activity determination.

MONCOLOVÁ, V. - ZEMEK, J.: Stabilisierung der Enzyme als interner Standarde in der biotechnologischen Enzymanalyse. I. eS-Test Enzymstandard der Malz- α -Amylase. Kvas. prům., **38**, 1992, Nr. 9, S. 262 - 265

Die Arbeit enthält die Ergebnisse der Tests des Tabletten-eS-Tests des Enzymstandards der Malz- α -Amylase, der durch die Verankerung der Malz α -Amylase auf der Oberfläche mittels Vernetzung des modifizierten Colagens aufbereitet wird, und zwar mit Hinsicht zu der Masse der Tabletten (Variationskoeffizient $v=1,80\%$) und zu der Genauigkeit der Bestimmung der Aktivität (Variationskoeffizient $v=1,92\%$).

Mittels des beschleunigten Tests unter extremen Bedingungen wurde die Stabilität des Enzymstandards getestet (in Abhängigkeit von der Temperatur und der Zeit der Tablettenexposition).

Bei der Lagertemperatur von 4 bis 8 °C während 2 Jahren bewegt sich die Abnahme des festgestellten Wertes der enzymstandardaktivität im Rahmen des Genauigkeitsintervalls bei der Aktivitätsbestimmung mittels des eS-Tests Amylase.