

Stanovení xylanase aktivity tabletovým eS-Testem Xylanasa

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

Klíčová slova: xylanasa, spektrofotometr, tabletový eS-Test, aktivita

Ú V O D

β -xylanasa je enzym hemicelulasového typu, který na rozdíl od β -xylosidasy štěpí řetězec β -xylanu endo-mechanismem. Xylan - 4-xylohydrolasa je známa jako xylanasa cytosolového komplexu ječmene a sladu (EC 3.2.1.8). Tento enzym je zodpovědný za hydrolyzu β -1,4-xylanu hemicelulasového komplexu ječmene v průběhu sladování a tak se významně podílí na rozluštění zrna. Dobře rozluštěný slad se snadněji zpracovává ve varné s vyšším varným výtěžkem a získaný extrakt sladiny je kvalitativně cennější (1).

β -xylanasa spolu s dalšími enzymy celulolytického komplexu se využívá k přípravě rostlinných protoplastů, ale i v medicíně, kde je součástí přípravků na zabezpečení průchodnosti střev při kolikách z nadměrného požívání zeleniny.

β -xylanasa jako součást hemicelulasového komplexu se využívá průmyslově v biochemických postupech přípravy čisté celulosy.

Metody, využívané ke stanovení aktivit xylanolytických enzymů, jsou chemické, založené na stanovení přírůstku redukujících skupin sacharidů, uvolněných z nativní formy β -xylanu anebo jeho modifikací.

V současnosti je známých několik metod stanovení β -xylanase aktivity. Tyto metody jsou založeny na stanovení koncentrace uvolněných redukujících sacharidů (xylosy, xylobiosy, xylotriosy, apod.) z xylanu [2], 4-*o*-methyl-D-glukuronoxylanu [3], připravených z kůry listnatých dřevin. Stanovení xylanase enzymové aktivity podstatně zjednodušuje zavádění chromolytických substrátů [4-5]. V tomto ohledu je důležitá nejen standardnost výchozího xylanu [6], ale i způsob a provedení chemické reakce s reaktivním barvivem a v neposlední míře i standardní úprava substrátu ve formě tabletového eS-Testu [7].

Předložená práce se zabývá vlastnostmi soupravy eS-Test xylanasa a jejím využitím při analýze některých průmyslových enzymů a při charakterizaci cytosolového komplexu ječmene a sladu.

M A T E R I Á L A M E T O D Y

Enzymy. Sladová β -xylanasa byla extrahována z komerčních sladů postupem podle [8]. Preparáty bakteriálních enzymů GPG-L poskytla firma Naarden Int. z Nizozemí a enzymové preparáty Filtrase B a Filtrase AM firma Chemifarma z Rakouska. Filtrase AM označujeme též jako "xylanasa". Tablety eS-Test Xylanasa jsou výrobkem firmy Bioeffect, Lehnice.

Referenční metodou byl postup, využívající kyselinu 3,5-dinitrosalicylovou (3,5-DNS) pro stanovení redukujících sacharidů uvolněných β -xylanase z xylanu [9].

Reakční směs se inkubovala po dobu 15 min. Substrátem při stanovení aktivity referenční metodou byl nativní xylan z kukuřice [7]. Aktivita se sledovala při pH 5,0 (fosfátový tlumivý roztok 0,05 mol.l⁻¹, 30 °C) pro enzymy bakteriálního původu a při 30 °C ve fosfátovém tlumivém roztoku s HCl (pH 4,5; 0,05 mol.l⁻¹) pro sladový enzym. Enzymová reakce se zastavila přidáním zastavovacího roztoku o složení: 10 g Na₂CO₃, 900 ml H₂O a 100 ml acetonu. D-xylosa k sestrojení kalibrační křivky pro referenční metodu byla produktem firmy Sigma (USA).

V Ý S L E D K Y A D I S K U S E

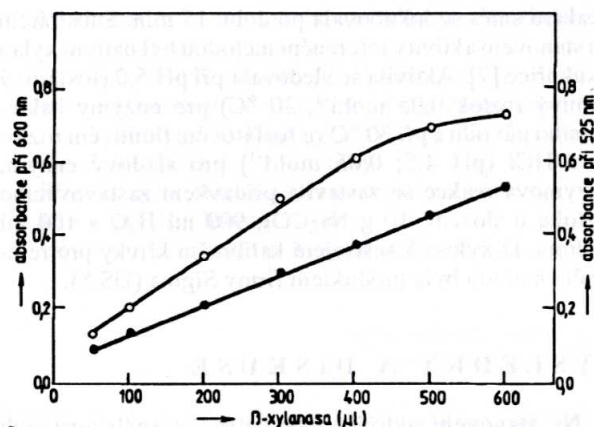
Na stanovení aktivity β -xylanasy v analyzovaných vzorcích jsme použili námi vypracovaný postup uvedený v tabulce 1. Tento postup jsme zopakovali v šesti různých

Tab. 1 Postup stanovení enzymové aktivity za použití eS-Testu Xylanasa

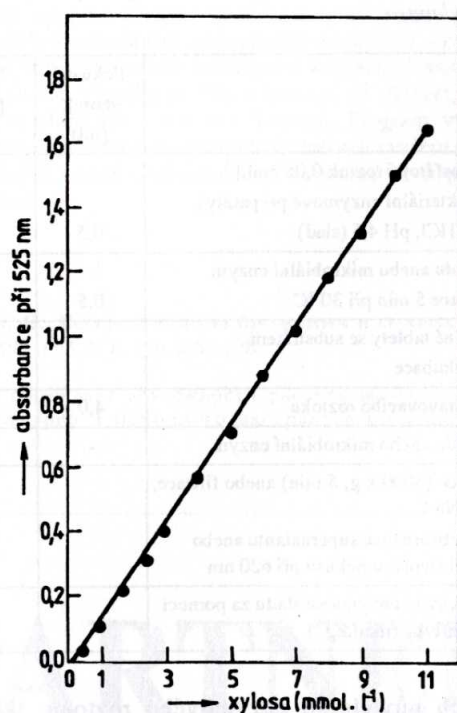
	Pokusný vzorek (ml)	Slepý pokus (ml)
Tlumivý fosfátový roztok 0,05 mol.l ⁻¹ , pH 5,0 (bakteriální enzymové preparáty), fosfátový, HCl, pH 4,5 (slad)	0,5	0,5
Extrakt sladu anebo mikrobiální enzym Předinkubace 5 min při 30 °C	0,5	-
Přidání jedné tablety se substrátem - 60 min inkubace		
Přidání zastavovacího roztoku	4,0	4,0
Extrakt sladu anebo mikrobiální enzym	-	0,5
Centrifugace (3000 x g, 5 min) anebo filtrace, Whatman No 1 Stanovení absorbance supernatantu anebo filtrátu vůči slepému pokusu při 620 nm		
Přepočet aktivity enzymu ve sladu za pomoci kalibrační křivky (μkat.kg ⁻¹)		

přídavcích původního enzymového roztoku, tak aby výsledný objem byl 1 ml a paralelně ve stejných ředěních jsme jej porovnali s referenční metodou. Vztah mezi hodnotou změřené absorbance a objemem přidaného enzymového preparátu β -xylanasa u metody eS-Test Xylanasa a u referenční metody s použitím 3,5-DNS je uveden na obr.1. Pro referenční metodu s 3,5-DNS kyselinou jsme sestrojili kalibrační křivku na D-xylosu (obr.2). Za pomoci této kalibrační křivky jsme transformovali hodnoty absorbance naměřené referenční metodou na hodnoty uvolněných redukujících sacharidů a ty jsme následovně

přepočítali (zahrnutím zředovacích poměrů a reakčního času) na hodnoty enzymových aktivit. Vypočtené hodnoty enzymových aktivit v $\mu\text{kat.kg}^{-1}$ jsme vynesli do grafu oproti odpovídajícím hodnotám absorbance, změřené při 620 nm tabletovým eS-Testem Xylanasa a tímto způsobem jsme sestavili kalibrační křivku (obr.3). Tato kalibrační křivka je součástí tabletového testu.



Obr. 1 Vztah mezi hodnotou absorbance a objemem přidávaného enzymového preparátu xylanasa (0,1 % roztok), při stanovení eS-Testem (●) a referenční metodou (○)



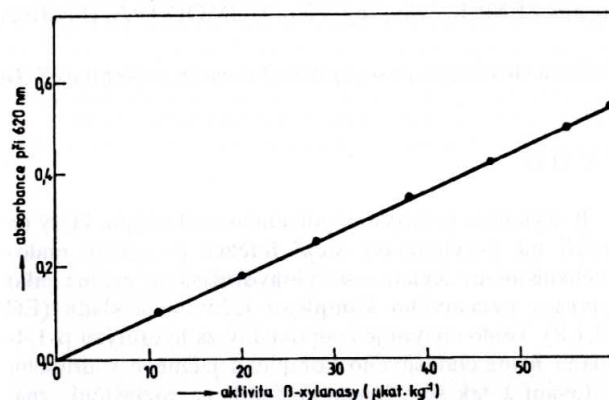
Obr. 2 Kalibrační křivka referenční metody s 3,5-DNS kyselinou a D-xylosou

Matematickým vyjádřením kalibrační křivky je vztah:

$$a = k_1 A + k_2,$$

kde a je aktivita β -xylanasy ($\mu\text{kat.kg}^{-1}$) a A je absorbance při 620 nm, k_1 a k_2 jsou konstanty, závislé především na

způsobu modifikace xylanu. Pro modifikovaný xylan v tabletách eS-Test Xylanasa $k_1 = 103,8$ a $k_2 = 1,96$.



Obr. 3. Kalibrační křivka $a = f(A_{520})$ na stanovení aktivity β -xylanasy v preparátu "xylanasa" pomocí eS-Testu Xylanasa

Tab. 2 Přesnost stanovení aktivity β -xylanasy v sérii eS-Testem Xylanasa.

Opakovaná stanovení (10) z jednoho roztoku enzymu "Xylanasa"

Vzorek	Absorbance 620 nm	Aktivita ($\mu\text{kat.kg}^{-1}$)	Průměrná hodnota \bar{x}	Odchylka od průměru $x_i - \bar{x}$	Standardní odchylka s	v_k (%)
1	0,421	47	46,8	-0,2	$\pm 0,88$	1,88
2	0,415	46		-0,8		
3	0,435	48		1,2		
4	0,420	46,9		0,1		
5	0,408	45		-1,8		
6	0,414	46		-0,8		
7	0,418	47,5		0,7		
8	0,423	48		1,2		
9	0,412	45,6		-1,2		
10	0,419	47,6		0,8		

Poznámka:

v_k = variační koeficient

Hodnoty aktivit byly odečteny z kalibrační křivky (obr.3).

Tab. 3 Přesnost stanovení aktivity enzymu β -xylanasy opakovanou extrakcí ze sladu A [8] a následně eS-Testem Xylanasa

Vzorek	Absorbance 620 nm	Aktivita ($\mu\text{kat.kg}^{-1}$)	Průměrná hodnota \bar{x}	Odchylka od průměru $x_i - \bar{x}$	Standardní odchylka s	v_k (%)
1	0,428	51,6	49,5	2,1	2,96	5,98
2	0,442	55,0		5,5		
3	0,412	46,0		-3,5		
4	0,418	47,5		-2,0		
5	0,422	48		-1,5		
6	0,431	52,5		3,0		
7	0,425	48,5		-1,0		
8	0,415	46,7		-2,8		
9	0,408	45,5		-4,0		
10	0,435	53,7		4,0		

Poznámka

Hodnoty aktivit byly odčítány z kalibrační křivky (obr.3)

V tabulce 2 jsou shrnuty výsledky přesnosti stanovení aktivity β -xylanasy eS-Testem Xylanasa. Pro aktivitu β -xylanasy $46,8 / \mu\text{kat.kg}^{-1}$ je hodnota variačního koeficientu $v_K = 1,88 \%$. V případě desetinásobně opakované extrakce sladových enzymů a následného stanovení β -xylanase aktivity se variační koeficient zvýšil na hodnotu $5,98 \%$ (tabulka 3).

Tab. 4 Stanovení viskozity, diastatické mohutnosti a aktivity β -xylanasy ve sladech a průmyslových enzimech

Vzorek	Viskozita sladiny (mPa.s)	Diastatická mohutnost (j.W.K.)	Aktivita ($\mu\text{kat.kg}^{-1}$)
slad A	1,52	210	48
slad B	1,54	275	14
slad C	1,52	290	12
slad D	1,55	250	46
slad E	1,57	215	10
slad F	1,58	220	9
slad G	1,56	232	18
slad H	1,54	245	42
slad I	1,54	220	10
slad J	1,52	245	14
GPG-L	-	-	486,0
Filtrase B	-	-	615,0
Filtrase AM	-	-	735,0

Poznámka

Hodnoty aktivity β -xylanasy byly odčítány z kalibrační křivky (obr.3).

Pro kompletní standardizaci pracovního postupu mezi laboratorní kontroly přesnosti spektrofotometrů je nutno použít eS-Test Barevný standard s deklarovanou hodnotou absorbance a enzymový standard β -xylanasy v tabletové formě s deklarovanou aktivitou [10].

Z Á V Ě R

Z prezentovaných výsledků vyplývá, že stanovení aktivity β -xylanasy tabletovým eS-Testem lze provádět standardním postupem, stejně, jako uvádíme v našich předcházejících publikacích v případě stanovení aktivit jiných biotechnologicky významných hydrolas příslušnými eS-Testy [11-20]. Stanovení β -xylanase aktivity představuje důležitou charakteristiku cytasového sladového komplexu.

LITERATURA

- [1] MOŠTEK, J.: Sladařství, 1.vyd., SNTL, Praha, 1975.
- [2] Pat.Cs. AO 195 527
- [3] Pat.Cs. AO 231 686
- [4] ZEMEK, J. a kol.: in Progress in Biotechnology, Vol. 4, Enzyme Technologies (Blažej, A., Zemek, J. eds.) Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, New York, Tokyo, 1988, s.469
- [5] BIELÝ, P., MARKOVIČ, O., MISLOVIČOVÁ, D.: Analytical Biochem., 144, 1985, s.147
- [6] KUSAKABE, I. a kol.: Agric. Biol.Chem., 47, 1983, s.2713
- [7] Pat.Cs. AO 266 289
- [8] McCLEARY, B.V., SHAMER, L.: J.Inst.Brew., 93, 1987, s.18
- [9] DENAULT, L. a kol.: J.Am.Soc.Brew.Chem., 36, 1978, s.18
- [10] JANIŠ, J. a kol.: Biochem.Clin.Bohemoslov., 11, 1982, s.357

- [11] ZEMEK, J. a kol.: Biotechnology and Food Chemistry (Holló, J., ed.), Akadémiai Kiadó, Budapest, 1988, s.345
- [12] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J., KUNIAK, L.: Kvas.prům., 34, 1988, s.290
- [13] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J., KUNIAK, L.: Kvas.prům., 34, 1988, s.161
- [14] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J.: Kvasný prům., 35, 1989, s.136
- [15] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J.: Kvas.prům., 37, 1991, s.37
- [16] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J.: Kvas.prům., 35, 1989, s.229
- [17] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J.: Kvas.prům., 36, 1990, s.289
- [18] MONCOLOVÁ, V., ZEMEK, J.: Kvas.prům., 38, 1992, s.262
- [19] ZEMEK, J., HOMOLOVÁ, V.: Kvas.prům., 39, 1993, s. 69
- [20] ZEMEK, J., HOMOLOVÁ, V.: Kvas.prům., v tisku.

Lektoroval Ing.P.Dostálek, CSc.

Do redakce došlo 29.3.1993

ZEMEK, J.-HOMOLOVÁ, V.: Stanovení xylanase aktivity tabletovým eS-Testem Xylanasa. Kvas.prům., 39, 1993, č.8, s.229 - 231

Je popsána metoda stanovení xylanase aktivity některých průmyslových enzymů a její použití při charakterizaci cytasového komplexu sladu. Postup je standardizován do formy tabletového eS-Testu používaného již pro stanovení aktivit řady dalších biotechnologicky významných hydrolas.

Земек, И. - Гомолова, В.: Определение ксиланазной активности таблетным eS-Тестом Ксиланаса. Квас. прум., 39, 1993, №8, стр. 229 - 231

Описан метод определения ксиланазной активности некоторых промышленных ферментов и ее применение при описании характеристики цитасного комплекса солода. Ход проведения стандартизован в форме таблетного eS-Теста, применяемого уже для определения активностей многих других биотехнологически значительных гидролаз.

ZEMEK, J.-HOMOLOVÁ, V.: Determination of Xylanase Activity with Tablet eS-Test Xylanase: Kvas.prům., 39, 1993, No.8, pp 229 - 231

The method for a determination of xylanase activity of some industrial enzymes and its application for the characteristics of cytase complex of malt is described. The procedure is standardized into the form of the tablet eS-Test that has already been used for a determination of activities of many other biotechnologically significant hydrolases.

ZEMEK, J.-HOMOLOVÁ, V.: Bestimmung der Xylanase-Aktivität mittels Tabletten-eS-Test Xylanase. Kvas.prům., 39, 1993, Nr.8, S. 229 - 231

Es wird eine Methode zur Bestimmung der Xylanase-Aktivität einiger industrieller Enzyme beschrieben und ihre Anwendung für die Charakteristik des Cytase-Komplexes des Malzes erörtert. Die Methode ist in die Form des Tabletten-eS-Testes standardisiert, der für die Bestimmung der Aktivität einer ganzen Reihe weiterer biotechnologisch bedeutender Hydrolasen benutzt wird.