

# STANOVENÍ INULINASOVÉ AKTIVITY ES-TESTEM INULINASA

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

**Klíčová slova:** inulinasa, spektrofotometr, tabletový eS-test, aktivita

## Ú V O D

Enzym inulinasa (inulin-1-fruktanohydrolasa, E.C. 3.2.1.7) hydrolyzuje  $\beta$ -2,1 fruktanové vazby inulinu tak, že dochází k odštěpování fruktofuranosových jednotek z polyfruktanových řetězců inulinu. Exo-mechanismem působící inulinasa a invertasa ( $\beta$ -D-fruktofuranosidasa,  $\beta$ -D-fruktofuranosid fruktohydrolasa, E.C.3.2.1.26) odštěpují z neredukujících konců inulinu monomery D-fruktosy. Vedle exo-inulinasy, působící z neredukujících konců biopolymeru, endo-inulinasa atakuje řetězce inulinu náhodně, převážně uprostřed polyfruktanových řetězců.

Enzym inulinasa se využívá k přípravě fruktosových roztoků (o vyšší sladivosti než jsou např. sacharosové, při stejné energetické hodnotě) z inulinu, které mají funkci alternativního sladidla, vhodného pro diabetiky a redukční diety, s upotřebením především v průmyslu nápojů [1]. Touto cestou lze připravit tzv. vysokofruktosové sirupy z inulinu cikorky (*Cichorium intybus*), dalií (*Dahlia variabilis*), anebo jeruzalémských artyčoků (*Helianthus tuberosus*). Enzymatická hydrolýza je výhodnější než chemická, jelikož nedochází k tvorbě tmavě zbarvených rozkladných produktů.

V současné době je známa celá řada metod na stanovení inulinasové enzymové aktivity. Tyto metody, obdobně jako i v případě dalších hydrolas polysacharidů, jsou založeny na stanovení koncentrace uvolněných redukcí cukrů, hydrolytických produktů reakce inulinasy s inulinem. Tyto metody jsou však nespecifické [3].

Stanovení inulinasové enzymové aktivity je zjednodušeno zavedením chromolytických substrátů [4]. V tomto ohledu je důležitá nejen standardnost výchozího inulinu, ale i standardní způsob modifikační reakce s bifunkčním činidlem a reaktivním barvivem ve formě eS-testu [4] tak, aby při stanovení inulinasové aktivity neinterferovala  $\beta$ -D-fruktosidasová (isomerasová) aktivita [5].

Předložená práce se zabývá vlastnostmi soupravy eS-test inulinasa a jejím využitím při stanovení aktivity enzymů inulinasového komplexu a  $\beta$ -D-fruktofuranosidasy.

## M A T E R I Á L A M E T O D Y

### Enzymy

Endoinulinasa se získala zahuštěním extracelulárního média *Kluyveromyces marxianus var. bulgaricus* CCY-43-3-3 (95  $\mu$ kat. $\text{mg}^{-1}$ ). Invertasa ( $\beta$ -fruktofuranosidasa,  $\beta$ -D-fruktofuranosid fruktohydrolasa E.C.3.2.1.26) z pekařských kvasnic *Saccharomyces cerevisiae* (6,6  $\mu$ kat. $\text{mg}^{-1}$ ) byla získána od firmy Sigma (St.Louis, USA). Tablety eS-test inulinasa jsou výrobkem firmy

Bioeffect. Inulin byl síťovaný 2-chloromethyloxiranem na stupeň síťování  $\eta = 0,02$  a modifikován reaktivní Remazolovou modří na stupeň substituce  $s = 0,11$  [4].

Referenční metodou byl postup, využívající kyselinu 3,5-dinitrosalicylovou (DNS) k stanovení redukcí sacharidů uvolněných v reakcích inulinasy, resp. invertasy s inulinem [3]. Reakční směs se inkubovala v citrát-fosfátovém tlumivém roztoku (0,05 mol. $\text{l}^{-1}$ , pH 4,5) při 30 °C po dobu 15 min. Inulin se získal z cikorky postupem podle [4].

Reakce s eS-testem inulinasa se zastavila přidávkou zastavovacího roztoku o složení  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (10 g) v 900 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a 100 ml acetonu.  $\beta$ -D-(-)fruktosa (krystalická) 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

Při stanovení aktivity inulinasy jsme postupovali podle postupu, shrnutého v tabulce 1.

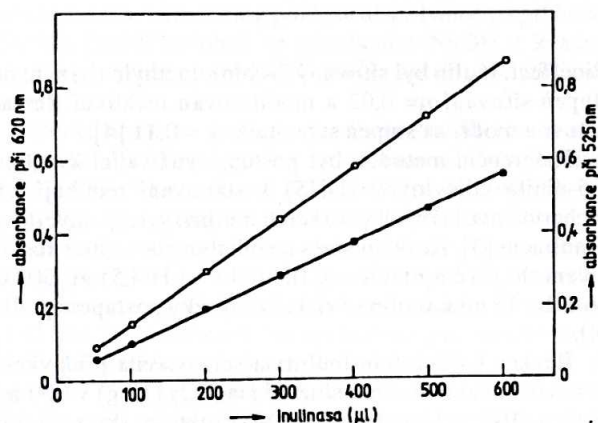
Tab. 1 Postup stanovení enzymové aktivity za použití eS-testu inulinasa

	Pokusný vzorek (ml)	Slepý pokus (ml)
Tlumivý roztok 0,05 mol. $\text{l}^{-1}$ citrát-fosfátový, pH 4,5	0,5	0,5
Předinkubace 5 min při 30 °C	+	+
Vzorek enzymu	0,5	-
Přidání jedné tablety eS-testu inulinasa a 60 min inkubace	+	+
Přidání zastavovacího roztoku	4,0	4,0
Vzorek enzymu	-	0,5
Odstředění (3000 x g, 5 min) anebo filtrace, Whatman N°1		
Stanovení absorbance supernatantu anebo filtrátu vzhledem k slepému pokusu při 620 nm		
Přepočet absorbance vzorku s enzymem na aktivitu ( $\mu$ kat. $\text{l}^{-1}$ ) pomocí kalibrační křivky		

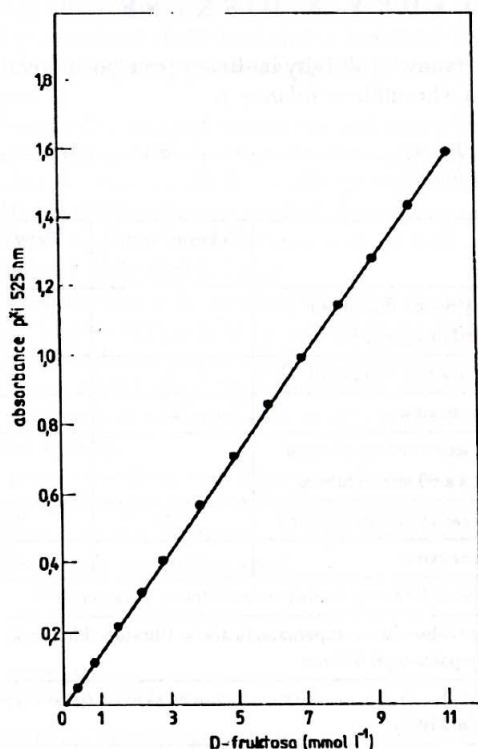
Na základě toho jsme postupovali při různých objemových přídávkách původního enzymového roztoku tak, aby výsledný objem analyzovaného vzorku pro eS-test inulinasa a referenční metodu byl 1 ml. Vztah mezi absorbancí při  $\lambda = 620$  nm pro eS-test inulinasa a absorbancí při  $\lambda = 525$  nm pro referenční metodu (za použití DNS) a objemem enzymu inulinasy ( $\mu$ l) je zobrazen na obr.1. Pro referenční metodu jsme sestrojili



kalibrační křivku s 3,5-dinitrosalicylovou kyselinou a D-fruktosou (obr.2). Za pomoci uvedených vztahů (obr.1 a 2) se zohledněním zředovacích poměrů a reakčních časů jsme zkonstruovali kalibrační křivku umožňující na základě spektrofotometrického měření hodnot absorbance při  $\lambda = 620$  stanovit aktivitu enzymu inulinasy (obr. 3). Tato kalibrační křivka je součástí tabletového testu.



Obr.1. Vztah mezi hodnotou absorbance při vlnových délkách 525 nm, resp. 620 nm a objemem přidaného enzymového preparátu inulinasy (0,15% roztok), při stanovení eS-testem (\*) a referenční metodou (o).



Obr.2. Kalibrační křivka referenční metody s 3,5-dinitrosalicylovou kyselinou a D-fruktosou.

Matematickým vyjádřením kalibrační křivky je vztah:

$$a = k_1 A + k_2,$$

kde  $a$  je aktivita inulinasy ( $\mu\text{kat.l}^{-1}$ ) a  $A$  je absorbance při vlnové délce  $\lambda = 620$  nm,

$k_1$  a  $k_2$  jsou konstanty závislé na způsobu modifikace inulinu.

Pro modifikovaný inulin v tabletách eS-test inulinasy  $k_1 = 12,8$  a  $k_2 = 0,08$ .

V tabulce 2 jsou shrnuty výsledky přesnosti stanovení aktivity inulinasy eS-testem.

Tab. 2 Přesnost stanovení aktivity inulinasy v sérii eS-testem inulinasy. Opakovaná stanovení ( $\bar{n} = 10$ ) z jednoho roztoku enzymu "inulinasy"

Vzorek	Absorbance při 620 nm (j)	Aktivita $x_i$ ( $\mu\text{kat.l}^{-1}$ )	Průměrná hodnota $\bar{x}$ ( $\mu\text{kat.l}^{-1}$ )	Odchylka od průměru ( $x_i - \bar{x}$ )	Směrodatná odchylka	Variační koeficient (%)
1.	0,301	3,95	3,98	-0,003	+0,05	1,26
2.	0,311	4,11		+0,13		
3.	0,296	3,90		-0,08		
4.	0,304	4,00		+0,02		
5.	0,306	4,03		+0,05		
6.	0,303	3,96		-0,02		
7.	0,297	3,90		-0,08		
8.	0,308	4,04		+0,06		
9.	0,307	4,03		+0,05		
10.	0,300	3,95		-0,03		

Hodnoty aktivity inulinasy byly odečteny z kalibrační křivky (obr.3).

Tab. 3 Stanovení aktivity  $\beta$ -D-fruktofuranosidasy (invertasy) za využití eS-testu inulinasy ( $\bar{n} = 10$ )

Vzorek	Absorbance při 620 nm (j)	Aktivita ( $\mu\text{kat.l}^{-1}$ )	Průměrná hodnota $\bar{x}$ ( $\mu\text{kat.l}^{-1}$ )	Odchylka od průměru ( $x_i - \bar{x}$ )	Směrodatná odchylka	Variační koeficient (%)
1.	0,068	0,8	0,87	-0,07	0,12	13,8
2.	0,061	0,75		-0,12		
3.	0,085	1,2		0,43		
4.	0,059	0,75		-0,12		
5.	0,071	0,81		-0,06		
6.	0,069	0,8		-0,07		
7.	0,075	0,83		-0,04		
8.	0,081	1,1		0,23		
9.	0,077	0,86		-0,01		
10.	0,072	0,83		-0,04		

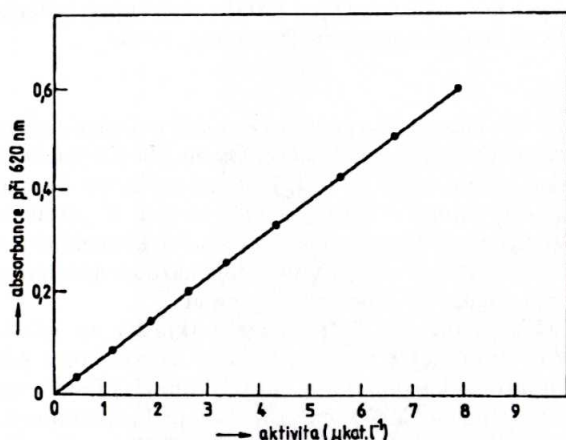
Hodnoty aktivity inulinasy byly odečteny z kalibrační křivky (obr.3). V pokuse byl použit roztok  $\beta$ -D-fruktofuranosidasy o aktivitě  $33 \mu\text{kat.l}^{-1}$ .

Pro aktivitu inulinasy  $3,98 \mu\text{kat.l}^{-1}$  je hodnota variačního koeficientu  $v_k = 1,26 \%$ .

Enzym  $\beta$ -D-fruktofuranosidasa je schopen exo-mechanismem hydrolyzovat řetězců inulinu z neredukujících konců.  $\beta$ -D-fruktofuranosidasa je přitom částečně nespecifická k chemickým obměnám svého reakčního substrátu substitucí hydroxylových skupin. [6].

Jak ukazují výsledky shrnuté v tabulce 3, použitím síťovaného inulinu ( $\eta = 0,02$ ) tento modifikovaný biopolymer ztrácí substrátové vlastnosti pro  $\beta$ -D-frukto-

furanosidasu. Reálná aktivita tohoto enzymu na nativní inulin jako substrát ( $33 \mu\text{kat.l}^{-1}$ ) je potlačena síťováním inulinu na zdánlivou hodnotu  $0,87 \mu\text{kat.l}^{-1}$ , tj. na pouhých 2,6 %. Přitom všechny hodnoty z 10 opakovaných stanovení nepřekročily hodnotu absorbance 0,085. Tento modifikační postup analogicky aplikovaný na inulin z modifikačních reakcí škrobu (potlačení amylolytických exo-enzymů) umožňuje přímé stanovení inulinasové aktivity v přítomnosti invertasy ( $\beta$ -D-fruktofuranosidasu).



Obr.3. Kalibrační křivka  $a=f(A_{620})$  na stanovení aktivity enzymu inuliny v preparátu "inulinasa" pomocí eS-testu inuliny.

Pro kompletní standardizaci pracovního postupu mezi laboratorní kontroly přesnosti spektrofotometrů je nutno použít eS-test Barevný standard s deklarovanou hodnotou absorbance a enzymový standard inuliny v tabletové formě s deklarovanou enzymovou aktivitou [8].

eS - test inuliny navazuje na soubor jednotných postupů pro stanovení aktivit biotechnologicky významných hydrolas [ 9 - 18 ].

## LITERATURA

- [1] FUCHS,A., DE BRUIJN,J.M., NIEDEVELD,C.J.: Antonie van Leeuwenhoek 51, 1985, s.333
- [2] GUIRAUD,J.P., GALZY,P.: Enzyme Microb. Technol. 3, 1981, s. 305
- [3] BAILEY,M.J., NEVALSINEN,M.H.: Enzyme Microb. Technol. 3, 1981, s.143
- [4] Pat. CS AO 274 948
- [5] ZEMEK,J. a kol.: Biotechnology and Food Chemistry (Holló, J., ed.), Akadémiai Kiadó, Budapest, 1988, s.345
- [6] ZEMEK,J., KUČÁR,Š.: Collection Czech. Chem. Commun. 53, 1988, s.173
- [7] ZEMEK,J., KUNIAK,L., MATUSOVÁ,A.: Makromol.Chem.Suppl. 9, 1985, s.219

- [8] JANIŠ,J. a kol.: Biochem.Clin. Bohemoslov. 11, 1982, s.357
- [9] MONCOLOVÁ,V., ZEMEK,J., KUNIAK,L.: Kvas.prům., 34, 1988, s.290
- [10] MONCOLOVÁ,V., ZEMEK,J., KUNIAK,L.: Kvas.prům., 34, 1988, s.161
- [11] MONCOLOVÁ,V., ZEMEK,J.: Kvas.prům., 35, 1989, s.136
- [12] MONCOLOVÁ,V., ZEMEK,J.: Kvas.prům., 37, 1991, s.36
- [13] MONCOLOVÁ,V., ZEMEK,J.: Kvas.prům., 35, 1989, s.229
- [14] MONCOLOVÁ,V., ZEMEK,J.: Kvas.prům., 36, 1990, s.289
- [15] MONCOLOVÁ,V., ZEMEK,J.: Kvas.prům., 38, 1992, s.262
- [16] ZEMEK,J., HOMOLOVÁ,V.: Kvas.prům., 39, 1993, s.69
- [17] ZEMEK,J., HOMOLOVÁ,V.: Kvas.prům., 39, 1993, s. 261
- [18] ZEMEK,J., HOMOLOVÁ,V.: Kvas.prům., v tisku

Lektoroval Ing.P.Dostálek

Do redakce došlo 17.5.1993

## ZEMEK,J.-HOMOLOVÁ,V.: Stanovení inulinasové aktivity eS-testem inuliny. Kvas.prům., 40, 1994, č.1., s. 13 - 15

Výsledky práce ukazují na vhodnost eS-testu inuliny ke stanovení aktivity enzymu inuliny a to i v přítomnosti  $\beta$ -D-fruktofuranosidasu (invertasy). eS-test inuliny tak doplňuje standardní postupy stanovení aktivit biotechnologicky významných hydrolas.

## ZEMEK,J.HOMOLOVÁ,V.: Inulinase Activity Assessment by Using es-Test Inulinase (Kvas.prům., 40, 1994, No.1., pp 13 - 15

The results of submitted work refer to availability of the es-test inulinase for inulinase enzyme activity assessment, even when  $\beta$ -D-fructofuranosidase (invertase) is presented. The eS-test inulinase thus completes standard methods used for activity assessment of biotechnologically significant hydrolases.

## ZEMEK,J.-HOMOLOVÁ,V.: Bestimmung der Inulinase-Aktivität mittels eS-Test Inulinase. Kvas.prům., 40, 1994, Nr.1, S. 13 - 15

Die Ergebnisse bestätigen die Eignung des eS-Tests Inulinase zur Bestimmung der Aktivität des Enzyms Inulinase, und zwar auch bei Anwesenheit der  $\beta$ -D-Fruktofuranosidase (Invertase). Der eS-Test Inulinase kann also als Ergänzung der Standardmethoden zur Bestimmung der Aktivitäten biotechnologisch bedeutender Hydrolasen angesehen werden.

## Земек, И. - Гомолова, В. : Определение инулиназной активности eC-тестом Инулиназа. Квас. прум., 40, 1994, №1 стр. 13 - 15

Результаты настоящей работы показывают удобность eC-теста Инулиназа для определения активности энзима инулиназы, и то и в присутствии  $\beta$ -Д-Фруктофуранидазы (инвертазы). eC-тест таким образом дополняет стандартные способы определения активностей биотехнологически значительных гидролаз.