

Stanovenie aktivít proteolytických enzýmov tabletovým S-TESTOM CELKOVÁ PROTEINÁZA

579 663

Ing. VIERA MONCOLOVÁ, Pivovary a sladovne, Výskumnno-vývojová základňa, 816 13 Bratislava
Ing. JIŘÍ ZEMEK, CSc., Agrogén Bratislava, JZD Agrokombinát Slušovice, 763 15 Slušovice

Kľúčové slová: *pivo, proteinázy, spektrofotometer, tabletový S-test, papain*

ÚVOD

Proteolytické enzýmy spolu s enzýmami amylo-lyticky reprezentujú najrozšírenejšiu skupinu biotechnologicky využívaných enzýmov. Aj keď technické využívanie proteináz, extraktov zo živočíšnych pankreasov v pracom procese je známe už od roku 1913 (patent O. Röhm) a živočíšne proteinázy nachádzali široké uplatnenie aj v ďalších odvetviach priemyslu [chymozín (E.C.3.4.23.4) v mliekárenstve, trypsín (E.C.3.4.4.4), chymotrypsín (E.C.3.4.4.5) a pepsín (E.C.3.4.1.1) v zdravotníctve a pri spracovaní mäsa] podobne ako aj proteinázy extrahované z rastlinného materiálu [papaín

(E.C.3.4.22.2), ficín (E.C.3.4.22.3) a bromelaín (E.C.3.4.22.4) pri čírení piva a zjemňovaní mäsa], najširšie uplatnenie nachádzajú proteinázy mikrobiálneho pôvodu, pripravované vo veľkoobjemových fermentačných procesoch od konca päťdesiatych rokov.

Široké uplatnenie proteináz v technickej praxi si vyžadovalo už v minulosti racionálnu aplikáciu týchto enzýmov v technologických procesoch (respektíve do výrobkov), čo predpokladalo zabezpečenie jednoduchej, spoľahlivej a pritom správnej metodiky k stanoveniu ich aktivít. Nejrozšírenejšimi postupmi sa stali metódy založené na prírastku absorbancie reakčného roztoku v ultrafialovej

oblasti svetla (280 nm), spôsobené tvorbou peptidov, ktoré sú rozpustné aj v prítomnosti kyseliny trichlórooctovej [1]. Modifikáciu tejto metódy pre viditeľnú oblasť spektra umožnil príavok fenolového reagens [2]. Tak aj do biotechnológií prenikajú jednotky, pôvodne využívané len v úzkej oblasti výskumu, tzv. Kunitzove, Ansonove a pod. [3]. Srinivasanove jednotky proteinázovej aktivity zasa vychádzajú z rýchlosťi potrebnej k zrazeniu odtučneného mlieka [4]. Uvedené dnes už klasické metódy sú komplikované, čo sa týka technického prevedenia, rôznorodosť použitých substrátov neumožňuje unifikáciu metódy a štandardnosť jej prevedenia, a preto nie sú vhodné k rutinnej analýze. V tomto ohľade podstatný prínos predstavujú dva typy substrátov novej generácie, a to nízkomolekulové chromogénne substráty a ďalej vysokomolekulové substráty, sietované proteíny obsahujúce kovalentne naviazané reaktívne farbivá. Chromogénnymi substrátkami proteináz sú napr. 4-nitroanilidy aminokyselin a peptidov [5—8]. Tak chromogénnym substrátom pre papaín je napr. Suc-Leu₂-Cys(Bzl)-4-nitro-anilid [5]. Aj keď chromogénne substráty tohto typu bývajú špecifickejšie, čo môže mať výhodu v prípade stanovenia aktivity jednej proteinázy v zmesi proteolytických enzýmov, známou nevýhodou chromogénnych substrátov je ich horšia manipulovateľnosť, zložitá príprava, tvorba prchavého nestabilného produktu a interferencia sfarbených zložiek prostredia s chromofórom produktu. Tieto nevýhody nemajú substráty chromolytickejho typu pripravené z proteínov (albumín hovädzieho séra, ovoalbumín, kazeín, denatuurovaný kolagén a pod.) sietovaných v miestach niektorých primárnych amino-alebo tiolových skupín elektrofilnými bifunkčnými činidlami (napr. 2-chlórometylloxirán, 2,2'-bis(oxiranylmetyl)éter, bis-izotiokyanát-L-lyzínu a pod.), modifikovaný ďalej v substitučnej reakcii s reaktívym farbivom, napr. Remazol Brilliant Blue R [9—13]. Substráty uvedeného typu našli už svoje uplatnenie v zdravotníctve [14] a v mikrobiológii pri sledovaní producentov proteináz platňovými radiálne difúzonymi metodami [14 až 15].

V predloženej práci sa prezentujú skúsenosti s rutinným využívaním chromolytickeho tabletového S-testu Celková proteináza pri dávkovaní preparátu Profix (papaín) používaného pri prevencii chladových zákalov piva.

MATERIÁL A METÓDY

Albumín hovädzieho séra (AHS) sa zakúpil v Imune n. p., Šarišské Michaľany. D,L-Alanín bol výrobok fy Merck (NSR), kyselina 2,4,6-trinitrobenzénsulfónová (2,4,6-TNBS) sa získala od fy Serva (NSR). Tabletný S-TEST CELKOVÁ PROTEINÁZA je výrobok JZD Agrokombinát (Agrogén), Slušovice. Enzýmová reakcia s S-TESTOM CELKOVÁ PROTEINÁZA sa zastavila príavkom zastavovacieho roztoku o zložení 10 g uhličitanu sodného v 900 ml destilovanej vody a 100 ml acetónu. Preparát Profix sa dováža od fy Biocon (Írsko) pre účely koloidnej stabilizácie piva.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Ako referenčnú metódu k stanoveniu proteolytickej aktivity sme zvolili nami modifikovaný postup využívajúci ako substrát albumín hovädzieho séra a kyselinu 2,4,6-trinitrobenzénsulfónovú ako činidlo špecificky reagujúce s primárnymi aminoskupinami [16]. Stanovenie prírastku primárnych aminoskupín ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) v časovom intervale umožňuje totiž štandardné vyjadrenie proteolytických aktivít v $\mu\text{kat.l}^{-1}$. Postup stanovenia aktivity papaínu v preparáte Profix referenčnou metódou je uvedený v tabuľke 1.

Tabuľka 1. Stanovenie aktivity papaínu v Profixe referenčnou metódou s 2,4,6-TNBS kyselinou a) pokusná vzorka

Fosfátový tlmičový roztok (0,05 mol.l ⁻¹ , pH 4,5)	(ml) 0,9
Roztok enzýmu (1 %, obj.)	0,1
<hr/>	
Predinkubácia 5 min pri 30 °C	
<hr/>	
Roztok albumínu (AHS) (1 %, hm)	1,0
<hr/>	
Inkubácia 1 hodinu pri 30 °C	
<hr/>	
Boritanový tlmičový roztok (0,1 mol.l ⁻¹ , pH 9,3)	2,0
2,4,6-TNBS kyselina (0,1 %, hm)	2,0
<hr/>	
Inkubácia 2 hodiny pri 30 °C	
<hr/>	
Zmeranie absorbancie reakčného roztoku oproti slepému pokusu pri 490 nm	
<hr/>	
b) slepý pokus	
<hr/>	
Fosfátový tlmičový roztok (0,05 mol.l ⁻¹ , pH 4,5)	0,9
Roztok enzýmu (1 %, obj.)	0,1
<hr/>	
Boritanový tlmičový roztok (0,1 mol.l ⁻¹ , pH 9,3)	2,0
2,4,6-TNBS kyselina (0,1 %, hm)	2,0
Roztok AHS (1 %, hm)	1,0
<hr/>	
Inkubácia 2 hodiny pri 30 °C	

Pri stanovení aktivity papaínu v preparáte Profix S-testom Celková proteináza navrhujeme postup podľa schémy v tabuľke 2. Postup pri stanovení proteolytických aktivít, ako je z tabuľky 2 zrejmé, je rovnaký ako postup uvádzaný pre stanovenie aktivít amylolytických enzýmov S-TESTOM SLADOVÁ AMYLÁZA [17] a β -glukanáz S-TESTOM LICHENÁZA [18] a S-TESTOM LAMINARINÁZA [19], čo je výhodné pre štandardizáciu a normalizáciu metodík stanovenia enzýmov v biotechnológií.

Paralelné stanovenie absorbancie, ktorú dáva roztok enzýmového preparátu Profix (1 % obj.) pri me-

Tabuľka 2. Postup stanovenia aktivity papáinu v Profixe S-TESTOM CELKOVÁ PROTEINÁZA

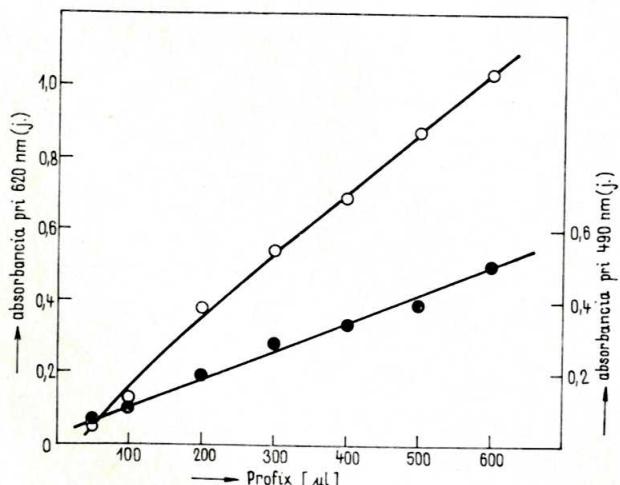
	Pokusná vzorka (ml)	Slepý pokus (ml)
Fosfátový tlivivý roztok (0,05 mol · l ⁻¹ , pH 4,5)	0,9	0,9
Roztok enzymu (1 % obj.)	0,1	—
Predinkubácia 5 min pri 30 °C		
Príďavok jednej substrátovej tablety — inkubácia 30 min		
Príďavok zastavovacieho roztoku	4,0	4,0
Roztok enzymu (1 %, obj.)	—	0,1
Centrifugácia (3 000 g, 5 min) alebo filtriácia, Whatmann No. 1 alebo Filtrak No. 595		
Zmeranie absorbancie supernatantu alebo filtrátu oproti slepému pokusu pri 620 nm		
Prepočet aktivity enzymového preparátu pomocou kalibračnej krivky (μkat · l ⁻¹)		

téde S-TEST CELKOVÁ PROTEINÁZA a pri referenčnej metóde s použitím 2,4,6-TNBS je znázornené na obr. 1. Kalibračná krivka pre metódu s 2,4,6-TNBS na D,L-alanín je znázornená na obr. 2. Z uvedených grafických závislostí bola zostrojená kalibračná krivka pre prepočet absorbancie na aktivitu papáinu (obr. 3).

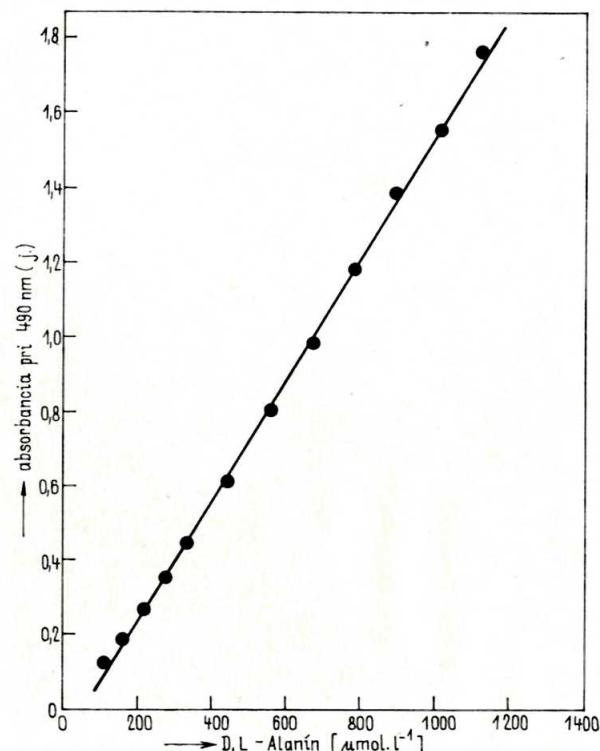
Kalibračná krivka pre proteolýzu chromolytickyho albumínu hovädzieho séra ako substrátu v tablete S-TEST CELKOVÁ PROTEINÁZA je vyjadrená vzťahom:

$$\alpha = k_1 A + k_2 ,$$

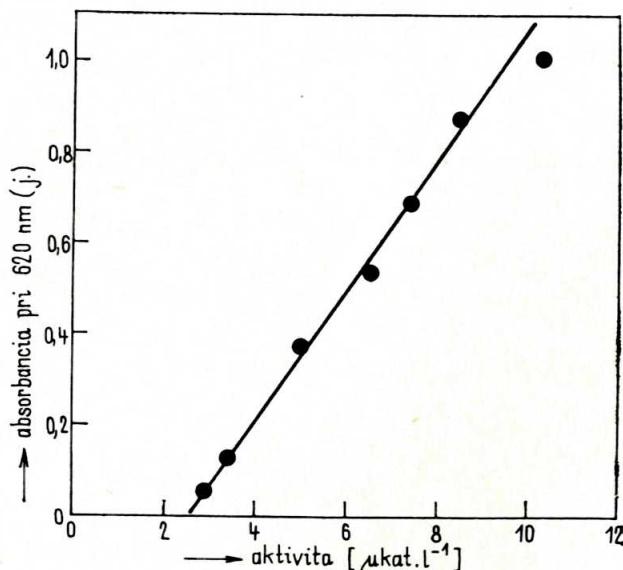
kde α je aktivity proteinázy ($\mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$) a A je absorbancia pri 620 nm a k_1 a k_2 sú konštanty závislé od



Obr. 1. Vzťah mezi noanotou absorbancie a objemom pridaného enzymového preparátu Profix (1%, obj.) pri metóde S-TESTOM CELKOVÁ PROTEINÁZA (○) a referenčnej metóde za využitia 2,4,6-TNBS kyseliny (●)



Obr. 2. Kalibračná krivka pre metódu s 2,4,6-TNBS kyselinou na D,L-alanín



Obr. 3. Kalibračná krivka $a = f(A_{620})$ k stanoveniu aktivity papáinu (Profix) S-TESTOM CELKOVÁ PROTEINÁZA

sposobu modifikácie a primárnej štruktúry proteínu. Pre použitý AHS ako substrát v tablete a papáin ako účinnú zložku preparátu Profix (obr. 3) $k_1 = 6,977 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$, $k_2 = 2,535 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$.

V tabuľke 3 sú zhrnuté výsledky presnosti stanovenia aktivity papáinu v Profixe S-TESTOM CELKOVÁ PROTEINÁZA. Pre aktivity papáinu $4,90 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$ bola hodnota variačného koeficienta $v_k = 1,6 \%$, čo odpovedá hodnote variačného koeficienta hmotnosti tablet $v_k = 2,3 \%$.

Tabuľka 3. Presnosť stanovenia aktivity papaínu v sérii S-testom Celková proteináza. Opakovane stanovenie [10] z toho istého roztoku enzymového preparátu Profix

Vzorka	Absorban-	Aktivita-	Priemer-	Odhýlka	Smerodajná	Variacný
	cia pri	(ukat. \cdot l $^{-1}$)	hodnota	od prieme-	odhýlka	koeficient
	630 nm	x	x	ru	x _{1-x}	(%)
1	0,354	5,0		0,10		
2	0,316	4,75		-0,15		
3	0,341	4,95		0,05		
4	0,314	4,95		0,05		
5	0,320	4,80		-0,10		
6	0,334	4,90	4,90	0	$\pm 0,08$	1,6
7	0,345	4,95		0,05		
8	0,336	4,90		0		
9	0,321	4,80		-0,10		
10	0,333	4,85		-0,05		

Pre kompletnejšiu štandardizáciu pracovného postupu a medzilaboratórnu kontrolu spoľahlivosti spektrofotometrov je potrebné použiť aj S-test Farebný štandard a Enzymový štandard papaína s deklarovanou aktivitou papaínu v tabletovnej forme, obidva výrobky JZD Agrokombinát Agrogen, Slušovice.

Lektoroval Ing. Jaroslav Čepička, CSc.

Literatúra

- [1] KUNITZ M.: J. Gen. Physiol., **30**, 1947, s. 291.
- [2] ANSON M. L.: Gen. Physiol., **22**, 1939, s. 79.
- [3] BERGMEYER H. U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Chemie Verlag, Weinheim, 1962, s. 808.
- [4] SRINIVASAN R. A., et al.: Appl. Microbiol., **12**, 1964, s. 475.
- [5] RICK W.: Methods of Enzym. Analysis (ed. Bergmeyer H. U.) Acad. Press, New York, 1974, s. 1011.
- [6] KASAFÍREK E., BARTÍK M.: Coll. Czechoslov. Chem. Commun., **45**, 1980, s. 442.
- [7] BARTÍK M., CHAVKO M., KASAFÍREK E.: Clin. Chem. Acta, **56**, 1974, s. 23.
- [8] KASAFÍREK E., FRIČ P., MALIŠ F.: FEBS Lett., **40**, 1974, s. 353.
- [9] Pat. ČSSR 194 592.
- [10] KÁŠ J., RAUCH P.: Labelled Proteins. Chemistry, Vol. 112, Springer, Berlin-Heidelberg, 1984, s. 163.
- [11] Pat. ČSSR: 256 084.
- [12] Pat. ČSSR: 257 112.
- [13] ZEMEK J., KUNIAK L., YOURKSHTOVICH T.: Makrol. Chem. Suppl., **9**, 1985, s. 227.
- [14] ZEMEK J., KUNIAK L., JANÍŠ J., JURČOVÁ Z.: Biochem. Clin. Bohemoslov., **12**, 1983, s. 61.
- [15] LUKÁŠOVÁ, J., ZEMEK J., AUGUSTÍN J., KUNIAK L.: Arch. Lebensmittelhygiene, **33**, 1982, s. 109.
- [16] DAVÍDEK, J. et al.: Laboratorní příručka analýzy potravin, SNTL, 1977, s. 199.
- [17] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J., KUNIAK L.: Kvas. prům., **34**, 1988, s. 290.
- [18] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J., KUNIAK L.: Kvas. prům., **34**, 1988, s. 161.
- [19] MONCOLOVÁ V., ZEMEK J.: Kvas. prům., **35**, 1989, s. 136.

Moncolová, V. - Zemek, J.: Stanovenie aktivít proteolitickej enzýmov tabletovým S-TESTOM CELKOVÁ PROTEINÁZA. Kvas. prům., **35**, 1989, č. 8—9, s. 229—232.

Prezentujú sa skúsenosti s využívaním chromolytické-

ho albumínu hovädzieho séra ako substrátu v tabletovnej forme S-TEST CELKOVÁ PROTEINÁZA pre stanovenie proteolitickej aktivity.

Referenčnou metódou bolo stanovenie využívajúce ako substrát albumín hovädzieho séra a kyselinu 2,4,6-trinitrobenzénsulfónovú pre stanovenie primárnych aminokyselín.

Pri stanovení aktivity papaínu S-TESTOM CELKOVÁ PROTEINÁZA sa navrhuje rovnaký postup ako pre stanovenie aktivít doterajšími S-testami, čo je výhodné pre štandardizáciu a normalizáciu metodik stanovenia aktivít enzýmov.

Pre aktivity papaínu $4,90 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$ bola hodnota variacného koeficentu $v_k = 1,6 \%$.

Монцолова, В. - Земек, И.: Определение активности протеолитических энзимов при помощи таблетного S-теста Общая протеиназа. Квас. прум., 35, 1989, № 8—9, стр. 229—232.

Представляется опыт по применению хромолитического альбумина говяжьей сыворотки как субстрата в таблетной форме S-тест Общая протеиназа для определения протеолитической активности.

Референтным методом было определение, использующее в качестве субстрата альбумин говяжьей сыворотки и 2,4,6-тринитробензольсульфоновую кислоту для установления первичных аминогрупп.

При определении активности папаина S-тестом Общая протеиназа предлагается такой же способ как для определения активности имеющимися тестами, что является выгодным для стандартизации и нормализации методик определения активностей энзимов.

Для активности папаина $4,90 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$ величина коэффициента вариаций составляла $v_k = 1,6 \%$.

Moncolová, V. - Zemek, J.: Determination of Proteolytic Activity Enzymes with the Tablet S-Test Whole Proteinase. Kvas. prům., **35**, 1989, No. 8—9, pp. 229—232.

The application of chromolytic albumin of beef serum as a substrate in a form of tablets S-test Whole proteinase for the determination of the proteolytic activity is described. As a comparative method, the determination of primary amino groups with albumin of beef serum and 2,4,6-tri-nitro-benzensulfonic acid was used. For the determination of papain activity with S-test Whole proteinase the procedure is the same as that used for this determination with other S-tests. For the papain activity of $4,90 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$ the value of the variation coefficient was $v_k = 1,6 \%$.

Moncolová, V. - Zemek, J.: Bestimmung der Aktivitäten der proteolytischen Enzyme mittels Tabletten-S-Test Gesamtproteinase. Kvas. prům., **35**, 1989, Nr. 8—9, S. 229—232.

Es werden die Erfahrungen mit der Anwendung des chromolytischen Albumins des Rindserums als Substrats in Tabletten-Form S-Test zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität präsentiert.

Als Referenzmethode wurde die Bestimmung appliziert, die als Substrat das Albumin der Rindserums und die 2,4,6-Trinitrobenzensulphosäure zur Ermittlung der primären Aminogruppen anwendet.

Zur Bestimmung der Aktivität des Papains mittels S-Test Gesamtproteinase wird das gleiche Verfahren wie für die Bestimmung der Aktivitäten durch die bisherigen S-Tests vorgeschlagen, was vorteilhaft vom Standpunkt der Standardisierung und Normalisierung der Methoden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten erscheint.

Für die Aktivität des Papains $4,90 \mu\text{kat} \cdot \text{l}^{-1}$ betrug der Wert des Variationskoeffizienten $v_k = 1,6 \%$.

Koupíme svíčkový naplavovací křemelinový filtr DESTILA 100—200 hl/h v provozuschopném stavu
Zn. IHNED

Státní statek Mikulov, závod 07, Valtice, tel. 94 329, s. Vlašic