

Stanovenie aktivity hlavných celulolytických enzýmov v potravinárskych a krmovinárskych enzýmových preparátoch

EDITA DUDÍKOVÁ

Súhrn. Pre účely špecifikácie enzýmových preparátov aplikovaných v potravinárskom a krmovinárskom priemysle sa urobil prieskum a výber metód na stanovenie aktivity hlavných zložiek celulolytického komplexu. Experimentálne sa overili tri typy metód, a to stanovenie endoglukanázovej aktivity (C_x -aktivity), metóda FPA (Filter Paper Activity) a chromolytické S-testy pre celkovú celulózu a celulózu C_x . Z výsledkov overovania viacerých vzoriek enzýmových preparátov vidieť, že na účely špecifikácie celulolytických enzýmov sú vhodné modifikované postupy odporúčané Komisiou pre biotechnológie pri IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

Celulázy nachádzajú široké uplatnenie pri sacharifikácii a konverzii celulózo-vých substrátov na krmovinárske účely, pre potravinársky a chemický priemysel a vo farmácii.

Najvýznamnejšími producentmi celuláz sú *Trichoderma viride*, *T. reesei*, *Myrothecium verucaria*, rôzne druhy *Aspergillus* a pod. Pri kultivácii produkčných mikroorganizmov sa do média uvoľňujú viaceré enzýmy celulolytického komplexu [1].

Enzýmy celulolytického komplexu možno charakterizovať takto:

C_1 -celulóza pôsobí na natívnu celulózu a odštiepuje lineárny nerozpustný glukózový reťazec z neredukujúcich koncov reťazcov. Uvoľňuje kryštalicky usporiadané fibrily vo vláknach natívnej celulózy.

C_x -celulóza nepôsobí na natívnu celulózu, ale katalyzuje hydrolýzu modifikovanej celulózy, napr. karboxymetylcelulózy (CMC), celodextrínov, rozdrvenej bavlny a pod. Generuje neredukujúce konce reťazcov.

β -glukozidáza štiepi disacharid celobiózu na glukózu a odštiepuje glukózu z nižších oligomérov.

V zmysle klasifikácie enzýmov sa hlavné enzýmy celulolytického komplexu označujú takto: C_1 je exo-1,4- β -glukanáza (1,4 β -D-glucan celobiohydrolase,

EC 3.2.1.91), C_x je endo-1,4- β -glukanáza (1,4-(1,3;1,4)- β -D-glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.4) a β -glukozidáza (β -D-glucosido-glucosylhydrolase, EC 3.2.1.21) [1–3].

Okrem týchto hlavných aktivít môžu byť v priemyselných enzýmoch ďalšie enzýmové aktivity, ktoré katalyzujú hydrolýzu škrobu, glukánov, xylánov, pektínov, lipidov a bielkovín.

Analýza a charakterizácia celulytických enzýmov je značne sťažená oproti iným skupinám enzýmov, nakoľko prírodný substrát je nerozpustný a štruktúrne variabilný. Veľký počet endoglukanáz a exoglukanáz pôsobí často synergicky nedostatočne známym spôsobom, pričom sa tvoria rôzne konečné produkty. Najviac sa prejavuje rozdiel v spôsobe účinku celuláz rôzneho pôvodu, najmä medzi celulázami fungálneho a bakteriálneho pôvodu. Vzhľadom na tieto ťažkosti je pochopiteľné, že v rôznych laboratóriách boli vyvinuté najmä empirické analytické postupy [4].

Najčastejšie používanými postupmi pri stanovení aktivity celulytických enzýmov sú metódy zakladajúce sa na meraní rýchlosti tvorby redukujúcich sacharidov počas inkubácie enzýmov s celulózovým substrátom, pri ktorom sa uplatňuje reakcia aldehydickej skupiny sacharidov s kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou (DNS), ferikyanidom alebo Somogyiho–Nelsonovým činidlom [2].

Stanovenie endoglukanázovej aktivity

Metóda stanovenia C_x -aktivity vypracovaná vo VÚPP v Prahe [5] sa zakladá na hydrolýze roztoku karboxymetylcelulózy (CMC) pri 40 °C a pH 5,5 počas 30 minút, pričom sa redukujúce látky stanovujú Somogyiho–Nelsonovým činidlom. Rovnaký postup uvádza firma Serva [6].

Najväčší európsky výrobca enzýmov firma Novo-Industri používa podobný postup, pre hydrolýzu však definuje konkrétny substrát CMC 7 L2 firmy Herkules (USA). Uvoľnené redukujúce látky sa stanovujú kolorimetricky reakciou s ferikyanidom. Jednotka aktivity je 1 NCU (Novo-Cellulase-Unit) [7].

Veľmi podobný variant metódy stanovenia aktivity endo-1,4- β -glukanázy odporúča Komisia pre biotechnológie pri IUPAC [4]. Ako substrát sa používa CMC ako v postupe Novo-Industri, redukujúce látky sa však stanovujú kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou. Hydrolýza substrátu prebieha pri teplote 50 °C.

Z metódy IUPAC vychádza aj modifikácia vypracovaná v Chemickom ústave SAV [8], ale sa nedefinuje konkrétny druh CMC ako v pôvodnej verzii. Hodnota nameranej C_x -aktivity však vo veľkej miere závisí od stupňa substitúcie (karboxymetylácie) použitého substrátu. Vzhľadom na túto skutočnosť nie je možné priamo porovnať namerané hodnoty C_x -aktivity s údajmi literatúry. Na stanovenie uvoľnených redukujúcich sacharidov sa používa kyselina 3,5-dinitrosalicylová. Aktivita sa vyjadruje v $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$, t. j. v $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Stanovenie aktivity FPA (Filter Paper Activity)

Druhým typom často používaných metód v praxi sú modifikácie stanovenia FPA [2, 4, 5, 8]. Pri analýze metódou FPA sa ako substrát používa filtračný papier Whatman 1. Uvoľnené redukujúce sacharidy sa stanovujú kolorimetricky kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou. Aktivita sa vyjadruje v $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$ [8].

Viskozimetrické stanovenie aktivity

Viskozimetrické metódy používajú ako substrát rozpustnú karboxymetylcelulózu [2, 4, 9]. Viskozimetrická metóda je uvedená napríklad v normách SRN pre enzýmové preparáty [10]. Obdobný postup uvádza Bergmeyer [2] a FAO/WHO pre špecifikáciu enzýmov [9]. Metóda je špecifická pre endo-1,4- β -glukanázy, nedochádza k interferencii exoglukanázami, avšak postup je pre prax veľmi náročný [2]. Inú viskozimetrickú metódu používa holandská firma Quest [11].

Chromolytické S-testy

Nedávno sa u nás vyvinuli tabletové testy na stanovenie aktivity celuláz, ktoré majú umožniť predovšetkým rutinné analýzy [12, 13]. S-testy sú dvojakeho druhu: S-test celuláza C_1 na stanovenie celkovej celulolytickej aktivity a S-test celuláza C_x na špecifické stanovenie endo-1,4- β -glukanázy.

Materiál a metódy

Použili sa vzorky enzýmových preparátov: Celluclast 1,5 L Novo Industri (*Trichoderma reesei*), Cellulase 0,56 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ Serva (*Penicillium citroviride*), Cellulase Type II 1 $\text{unit} \cdot \text{mg}^{-1}$ Sigma (*Aspergillus niger*), Phylacel Phylaxia (*Helminthosporium sativum*), Celuláza VÚPP Praha — Dolná Krupá (*Trichoderma viride*), Celuláza VÚPP Praha 10 000 $\text{mg RL} \cdot \text{g}^{-1}$ (*Trichoderma reesei* CC II), Celuláza CHÚ SAV — Dolná Krupá (*Trichoderma reesei*), Celuláza SAV P 20/86 (*Trichoderma reesei*), Celuláza 89 kvapalná Kolín (*Trichoderma reesei*). Väčšina chemikálií pochádza z firmy Lachema Brno. Ďalej sa použila Carboxymethylcellulose x Na-Salt Serva a potravinárska karboxymetylcelulóza zo škrobárni Havlíčkův Brod. S-testy celuláza C_1 a celuláza C_x pochádzali z JZD Agrogen Slušovice a JRD Agrokombinát Lehnice.

Stanovenie karboxymetylcelulázovej aktivity C_x podľa VÚPP [5]

Metóda sa zakladá na enzýmovej hydrolyze roztoku karboxymetylcelulózy (CMC) a stanovení uvoľnených redukujúcich látok Somogyiho–Nelsonovým činidlom.

Definícia — jednotka aktivity U je množstvo enzýmu, ktoré za daných podmienok uvoľní z CMC redukujúce látky s redukčnou schopnosťou zodpovedajúcou 1 μ mol glukózy za 1 minútu.

Roztoky:

a) Acetátový tlmivý roztok (1 mol.l⁻¹), pH 5,5.

b) Substrát: 0,625 g potravinárskej CMC sa rozpustí v 50 ml H₂O pri 60 °C, po ochladení sa pridá 10 ml acetátového tlmivého roztoku pH 5,5 a objem sa doplní na 100 ml vodou.

c) Somogyiho činidlo:

roztok A — rozpustí sa 24 g bezvodého Na₂CO₃, 16 g NaHCO₃, 12 g vínanu Na-K a 144 g Na₂SO₄ v destilovanej vode na objem 800 ml,

roztok B — 4 g CuSO₄ · 5H₂O a 36 g Na₂SO₄ sa rozpustí v destilovanej vode na objem 200 ml.

Roztoky A a B sa uchovávali oddelene, pred použitím sa zmiešajú v pomere 4:1.

d) Nelsonovo činidlo: 25 g molybdénanu amónneho sa rozpustí v 450 ml destilovanej vody, pridá sa 21 ml koncentrovanej H₂SO₄ a roztok 3 g Na₂HAsO₄ · 7H₂O v 25 ml vody. Roztok sa nechá stáť 48 hodín pri 37 °C. Uchováva sa v tmavej fľaši.

Postup. Enzýmová hydrolyza prebieha pri 40 °C 30 minút v inkubačnej zmesi obsahujúcej 4 ml vytemperovaného substrátu a 1 ml vhodne zriedeného enzýmu. Reakcia sa zastaví prídavkom 1 ml Somogyiho činidla a po 20-minútovom varení a ochladení sa pridá 1 ml Nelsonovho činidla. Po doplnení vodou na 25 ml sa meria absorbancia v 1 cm kvete pri 500 nm. Súčasne sa urobí slepý pokus, pri ktorom sa vzorka enzýmu pridáva až po inkubácii a po pridaní Somogyiho činidla.

Kalibračná čiara. K 1 ml roztokov glukózy, ktoré obsahujú 50 až 300 μ g glukózy, sa pridajú 4 ml vody a 1 ml Somogyiho činidla. Ďalší postup je rovnaký ako pri vzorke enzýmu. Pre slepý pokus sa použije voda. Relatívne najmenší rozptyl výsledkov je v rozsahu absorbancie 0,12—0,26.

Výpočet aktivity:

Kvapalné enzýmové preparáty:

$$C_x\text{-aktivita} = \frac{G \cdot R}{30 \cdot 180} [\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}].$$

Tuhé enzýmové preparáty:

$$C_x\text{-aktivita} = \frac{G \cdot 1000}{30 \cdot 180 \cdot N} [\text{U} \cdot \text{g}^{-1}],$$

kde G je glukóza z kalibračnej čiary (μg), R — riedenie enzýmu, N — množstvo enzýmu v 1 ml roztoku (mg), 30 — prepočet na 1 minútu, 180 — prepočet na μmol glukózy, 1000 — prepočet na 1 g enzýmu.

Stanovenie karboxymetylcelulázovej (endoglukanázovej) aktivity C_x podľa [8]

Postup sa zakladá na enzýmovej hydrolýze roztoku karboxymetylcelulózy (CMC) a na spektrofotometrickom stanovení uvoľnených redukujúcich látok kyselinou 3,5-dinitrosalicylovou (DNS).

Definícia — jednotka aktivity U je množstvo enzýmu, ktoré za daných reakčných podmienok uvoľní 1 μmol ekvivalentov glukózy za 1 minútu.

Roztoky:

a) Citrátový tlmivý roztok ($0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), pH 4,8.

b) DNS-čínidlo: 10,6 g kyseliny 3,5-dinitrosalicylovej a 19,8 g NaOH sa rozpustí v 1416 ml destilovanej vody. Po rozpustení sa pridá 306 g vínanu sodno-draselného, 7,6 ml fenolu skvapalneného pri 50°C a 8,3 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Po rozpustení za miešania na magnetickej miešačke sa pH upraví tak, že sa 3 ml odobratého činidla titrujú s roztokom HCl ($0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na fenolftaleín a na každý spotrebovaný ml roztoku HCl pri titrácii sa do roztoku činidla pridajú 2 g NaOH. DNS-čínidlo sa uchováva v tme pri izbovej teplote.

Postup. Enzýmová hydrolýza prebieha 30 minút pri 50°C v sérii skúmaviek obsahujúcich 0,1, 0,2 a 0,5 ml vhodne riedeného enzýmu a doplnených na objem 0,5 ml citrátovým tlmivým roztokom o pH 4,8 po pridaní substrátu, t. j. 0,5 ml vytemperovaného roztoku Na-karboxymetylcelulózy Serva ($20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$) v citrátovom tlmivom roztoku. Po zastavení reakcie prídavkom 3 ml DNS-čínidla sa obsah skúmaviek povarí 5 minút vo vodnom kúpeli a do každej skúmavky sa pridá 15 ml destilovanej vody. Absorbancia sa meria v 0,5 cm kyvetách pri 550 nm oproti slepému pokusu, ktorý obsahuje namiesto enzýmu destilovanú vodu. Súčasne sa do pokusu zaradi vzorka so štandardom glukózy 0,5 mg v 1 ml vody.

Výpočet aktivity. Podobne ako v prípade stanovenia FPA nie je množstvo uvoľnených redukujúcich látok v celom rozsahu priamo úmerné koncentrácii

enzýmu v reakčnej zmesi. Preto sa na výpočet aktivity určilo kritické množstvo enzýmu, ktoré uvoľní z 10 mg substrátu 0,5 mg glukózy (5 % konverzia). Kritické množstvo enzýmu V_k sa zistí extrapoláciou z grafu pre absorbanciu zodpovedajúcu 0,5 mg glukózy.

Kvapalné enzýmové preparáty:

$$C_x\text{-aktivita} = \frac{0,5 \cdot R}{0,18 \cdot 30 \cdot V_k} = \frac{0,0926}{V_k} R [\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}]$$

Tuhé enzýmové preparáty:

$$C_x\text{-aktivita} = \frac{0,0926}{V_k \cdot N} 1000 [\text{U} \cdot \text{g}^{-1}],$$

kde V_k je kritické množstvo enzýmu (ml), R — riedenie enzýmu, N — množstvo enzýmu v 1 ml roztoku (mg), 1000 — prepočet na 1 g enzýmu.

Stanovenie aktivity FPA (Filter Paper Activity) [8]

Metóda je založená na enzýmovej hydrolýze filtračného papiera ako substrátu a na spektrofotometrickom stanovení celkového množstva uvoľnených redukujúcich látok v hydrolyzáte kyselinou 3,5-dinitrosalicylvou (DNS).

Definícia — jednotka aktivity 1 kkat je množstvo enzýmu, ktoré za daných reakčných podmienok uvoľní 1 nmol glukózy za sekundu.

Roztoky:

a) Citrátový tlmivý roztok ($0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), pH 4,8.

b) DNS-čínidlo ako je opísané v predchádzajúcom postupe.

Postup. Enzýmová hydrolýza prebieha tak, že do skúmaviek obsahujúcich 0,1, 0,2 a 0,5 ml vhodne riedeného roztoku enzýmu a doplnených na objem 1,5 ml citrátovým tlmivým roztokom pH 4,8 sa po vytemperovaní na 50°C pridá skrútený prúžok filtračného papiera Whatman 1 rozmerov asi $1 \times 6 \text{ cm}$, t. j. asi 50 mg. Zmes sa premieša, inkubuje sa 60 minút pri 50°C bez miešania a hydrolýza sa zastaví pridaním 3 ml DNS-čínidla. Farebná reakcia s DNS-čínidlom prebehne vo vriacom vodnom kúpeli počas 5 minút, pred meraním sa vzorky riedia pridaním 15 ml vody. Absorbancia sa meria pri 550 nm v 0,5 cm kyvetách oproti slepému pokusu, v ktorom sa namiesto enzýmu použila destilovaná voda. Súčasne sa do pokusu zaradí vzorka so štandardom glukózy 2 mg v 1,5 ml vody.

Nakoľko pri hydrolýze celulózy (filtračného papiera) nie je množstvo uvoľnených redukujúcich látok v celom rozsahu priamo úmerné množstvu enzýmu v reakčnej zmesi, arbitrárne sa stanovilo, že pre výpočet FPA aktivity sa bude

považovať kritické množstvo enzýmu, ktoré uvoľní z 50 mg substrátu 2 mg ekvivalentov glukózy. Kritické množstvo enzýmu V_k (ml) sa zistí extrapoláciou z grafu pre absorbanciu zodpovedajúcu 2 mg glukózy.

Výpočet aktivity:

Kvapalné enzýmové preparáty:

$$\text{FPA} = \frac{0,185 \cdot 16,7 \cdot R}{V_k} = \frac{3,08}{V_k} R [\text{nkat} \cdot \text{ml}^{-1}].$$

Tuhé enzýmové preparáty:

$$\text{FPA} = \frac{3,08}{V_k \cdot N} 1000 [\text{nkat} \cdot \text{g}^{-1}],$$

kde V_k je kritické množstvo enzýmu (ml), R — riedenie enzýmu, N — množstvo enzýmu v 1 ml roztoku (mg), 1000 — prepočet na 1 g enzýmu.

Chromolytické S-testy [12, 13]

Základný postup stanovenia enzýmovej aktivity S-testom je rovnaký pre S-test celulóza celková a S-test celulóza C_x . Zakladá sa na meraní intenzity sfarbenia degradačných produktov, ktoré sa vytvoria počas enzýmovej hydrolýzy tablety obsahujúcej príslušný substrát s kovalentne viazaným farbivom. Substrátom pre S-test celulóza celková je nerozpustná mikrokryštalická celulóza, pre S-test celulóza C_x hydroxyetylcelulóza.

Definícia. Jednotka aktivity u je relatívna aktivita, ktorá zodpovedá 1 mg chromolytického substrátu, zhydrolyzovanému za 1 hodinu.

Roztoky:

- a) citrátový tlmivý roztok ($0,05 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), pH 4,8,
- b) zastavovací roztok: 10 g Na_2CO_3 sa rozpustí v 900 ml vody a pridá sa 100 ml acetónu.

Postup. Do kónickej centrifugačnej kyvety, ktorá obsahuje 0,3 ml tlmivého roztoku a 0,2 ml vhodne riedenej vzorky enzýmu sa po vytemperovaní pridá substrátová tableta a zmes sa inkubuje pri 37°C 60 minút bez miešania. Reakcia sa zastaví prídavkom 3 ml zastavovacieho roztoku a zmes sa po 5 minútach odcentrifuguje. Meria sa absorbanca supernatantu pri 620 nm oproti slepému pokusu, pri ktorom sa roztok enzýmu pridá až po pridaní zastavovacieho roztoku.

Výpočet aktivity:

Kvapalné enzýmové preparáty:

$$\text{Relatívna aktivita} = \left(\frac{A_t}{50}\right)^{-1} \cdot A \cdot 5 = \frac{A}{A_t} \cdot 2,5 \cdot 10^2 \cdot R [\text{u} \cdot \text{ml}^{-1}]$$

Tuhé enzýmové preparáty:

$$\text{Relatívna aktivita} = \frac{A}{A_t \cdot N} \cdot 2,5 \cdot 10^5 [\text{u} \cdot \text{g}^{-1}]$$

kde A je absorbancia vzorky, A_t — absorbancia odpovedajúca celkom zhydrolyzovanému chromolytickému substrátu v tablete; je deklarovaná pre každú výrobnú šaržu testu, N — množstvo enzýmu v 1 ml roztoku (mg), R — riedenie enzýmu, 50 — množstvo modifikovaného substrátu v 1 tablete (mg), 5 — prepočet na objem vzorky 1 ml.

Výsledky a diskusia

Metódy stanovenia C_x aktivity

Na stanovenie endoglukanázovej aktivity (C_x -aktivity, karboxymetylcelulázevej aktivity) v enzýmoch pre potravinársky priemysel sa za účelom overenia a výberu rozpracovali dve metódy:

- metóda IUPAC, modifikovaná v Chemickom ústave SAV [8],
- metóda VÚPP [5].

Nakoľko sa v súčasnosti obe metódy používajú na čs. pracoviskách, ktoré sa venujú výskumu, produkcii a aplikácii celuláz, je otázka ich vzájomného porovnania aktuálna.

Na overenie metódy IUPAC, modifikovanej v Chemickom ústave SAV, sa použilo 9 vzoriek rôznych celulolytických enzýmov, medzi nimi aj vzorky celuláz vyvíjaných na čs. pracoviskách. Na rozdiel od pôvodnej metódy IUPAC sa pri tejto modifikácii nešpecifikuje konkrétny druh Na-karboxymetylcelulózy ako substrátu. Upozorňuje sa však na to, že hodnota nameranej C_x -aktivity výrazne závisí od stupňa karboxymetylácie použitého substrátu; substráty s vyšším stupňom substitúcie sú menej prístupné účinku endoglukanázy. Preto nie je možné exaktne porovnať namerané hodnoty C_x -aktivity s údajmi uvádzanými v literatúre, ak nebol použitý rovnaký druh Na-CMC [8].

Pre všetky vzorky sa experimentálne vyhľadali také koncentrácie enzýmových roztokov, aby hodnoty absorbancie po hydrolýze substrátu Na-CMC Serva (20 g.l⁻¹, pH 4,8) a reakcii s DNS-čínidlom boli len o málo nižšie a o málo

vyššie ako je absorbancia štandardného množstva glukózy, t. j. 0,5 mg. Ukázalo sa, že vzhľadom na nelineárnosť závislosti absorbancie od koncentrácie enzýmu je však aj pri extrapolácii na absorbanciu štandardu glukózy riziko nesprávneho vyhodnotenia značné. Keďže absorbancia štandardu glukózy je za podmienok metódy veľmi nízka, t. j. 0,08, z meraní vyplýva, že hodnoty absorbancie enzýmových roztokov na výpočet aktivity musia byť veľmi blízko tejto hodnote (od 0,05 do 0,11), inak dochádza k veľkým rozdielom pri výpočte aktivity. Väčšina vzoriek sa analyzovala niekoľkokrát a vyhodnotila sa reprodukovateľnosť nameraných hodnôt aktivity C_x -celulázy.

Reprodukovateľnosť sa pre jednotlivé enzýmy líši, priemerný variačný koeficient je asi $\pm 9\%$ (tab. 1).

Tabuľka 1. Porovnanie hodnôt C_x -aktivity rôznych celulytických enzýmov, stanovených podľa VÚPP [5] a modifikovanou metódou IUPAC [8]

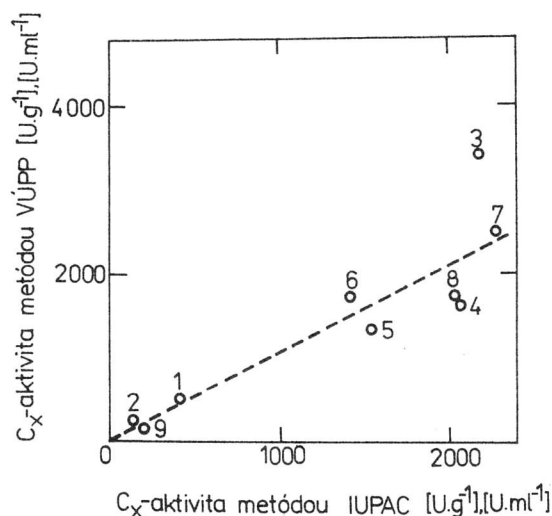
Table 1. Comparison between C_x -activities of various cellulolytic enzymes, determined according to Food Industry Research Institute FIRI [5] and by IUPAC modified method [8]

	Enzým ¹	VÚPP ² (40 °C, pH 5.5)		IUPAC ³ (50 °C, pH 4.8)		Variačný koeficient ³ [%]
		Aktivita ⁴		Aktivita ⁴		
		[U . g ⁻¹]	[U . ml ⁻¹]	[U . g ⁻¹]	[U . ml ⁻¹]	
1	Phylacel	510	—	405	—	± 7,4
2	Cellulase Sigma	220	—	142	—	± 6,3
3	Cellulase Serva	3420	—	2280	—	—
4	Celuláza SAV (D. Krupá)	1610	—	2110	—	—
5	Celuláza SAV P20/86	1300	—	1550	—	± 9,1
6	Celuláza VÚPP (D. Krupá)	1670	—	1420	—	—
7	Celuláza VÚPP (Praha)	2500	—	2305	—	± 10,6
8	Celluclast Novo	—	1660	—	2050	—
9	Celuláza (Kolín 89)	—	203	—	222	± 11,3

1 — Enzyme 2 — Food Industry Research Institute, 3 — International Union of Pure and Applied Chemistry, 4 — Activity, 5 — Coefficient of variation.

Ďalej sa overovala metóda vypracovaná vo VÚPP v Prahe, pri ktorej sa uvoľnené redukujúce látky stanovili Somogyiho–Nelsonovým činidlom. Obdobne ako pri modifikovanej metóde IUPAC nešpecifikuje sa v nej konkrétny druh karboxymetylcelulózy ako substrátu. Analyzovalo sa 9 vzoriek celuláz, ako substrát sa použila potravinárska karboxymetylcelulóza. Namerané C_x -aktivity sa porovnali s výsledkami získanými metódou IUPAC (tab. 1, obr. 1). Porovnanie metód zdanlivo zjednodušuje fakt, že aktivita sa pri oboch metódach definuje v μmol uvoľnených redukujúcich látok za 1 minútu, t. j. v U, avšak

rozdielne je vlastné stanovenie redukujúcich látok. Líšia sa aj reakčné podmienky, predovšetkým teplota hydrolýzy (40 a 50 °C). Rozdiel v pH inkubačných zmesí je nepodstatný (pH 5,5 a 4,8). Ďalej sa použili rôzne substráty, a to potravinárska CMC a Na-CMC Serva. Ako vyplýva z obr. 1, nie je medzi hodnotami C_x -aktivity nameranými oboma metódami preukázateľný lineárny vzťah.



Obr. 1. Vzťah medzi hodnotami C_x -aktivity pri rôznych enzýmoch, nameraných modifikovanou metódou IUPAC [8] a metódou VÚPP [5]. 1 — Phylacel, 2 — Cellulase Sigma, 3 — Cellulase Serva, 4 — Celuláza SAV, 5 — Celuláza SAV P20/86, 6 — Celuláza VÚPP — D. Krupá, 7 — Celuláza VÚPP Praha, 8 — Celluclast Novo, 9 — Celuláza Kolín 89.

Fig. 1. Relation between C_x -activity values for various enzymes, measured by IUPAC modified method [8] and FIRI (Food Industry Research Institute method) [5].

Ďalej sa overila správnosť vypočítanej hodnoty aktivity enzýmu Celluclast Novo metódou VÚPP porovnaním s deklarovanou aktivitou výrobcu. Toto porovnanie umožňuje definícia jednotky NCU (Novo-Cellulase-Unit) = 1 μmol redukujúcich látok za 1 minútu a veľmi podobné reakčné podmienky (40 °C, pH 4,8). Postup firmy Novo však používa substrát CMC Hercules 7LFD a stanovenie redukujúcich látok s ferikyanidom. Vzhľadom na uvedené rozdiely možno konštatovať, že nameraná aktivita 1430 $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$ (t. j. 1660 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$) relatívne dobre zodpovedá deklarovanej aktivite 1500 NCU $\cdot \text{g}^{-1}$.

Pri porovnaní nameranej hodnoty C_x -aktivity metódou podľa VÚPP pri vzorke celulázy z ich vlastného pracoviska treba zohľadniť skutočnosť, že aktivita tejto vzorky je deklarovaná ako 10 000 $\text{mg RL} \cdot \text{g}^{-1}$ (RL = redukujúce látky) a nie v $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$. Po prepočte nameranej aktivity a vyjadrení týmto spôsobom sme

pre vzorku celulózy z VÚPP získali hodnotu $13\,500\text{ mg RL} \cdot \text{g}^{-1}$. Rozdiel medzi deklarovanou hodnotou môže byť spôsobený predovšetkým rozdielnym substrátom, použitým na oboch pracoviskách (CMC Lovosa, typ TS-20 vo VÚPP).

Z výsledkov experimentálneho overovania modifikovanej metódy IUPAC odporúčanej Komisiou pre biotechnológie a so zreteľom na jej rozšírenie vyplýva, že tento postup možno navrhnuť na stanovenie endoglukanázovej aktivity pre účely špecifikácie celulolytických enzýmových preparátov u nás. Je však potrebné špecifikovať v metóde konkrétny druh CMC ako substrátu, aby výsledky z rôznych laboratórií mohli byť porovnateľné. Navrhuje sa overený substrát pre celulózu firmy Serva Carboxymethylcellulase Na-Salt.

Stanovenie celkovej celulolytickej aktivity (FPA)

Experimentálne sa overovala metóda stanovenia celkovej celulolytickej aktivity, označovaná ako metóda FPA (Filter Paper Activity), a to modifikácia postupu odporúčaného Komisiou pre biotechnológie pri IUPAC, vypracovaná v Chemickom ústave SAV [8]. Metóda FPA sa overila pri stanovení aktivity 9 vzoriek celúláz. Práca sa ďalej zamerala na stanovenie reprodukovateľnosti metódy v sériách analýz. Reprodukovateľnosť metódy FPA sa štatisticky vyhodnotila pri 4 vzorkách enzýmov a vypočítal sa priemerný variačný koeficient $\pm 8,5$ (tab. 2).

Postup podľa metódy FPA je jednoduchý, aktivita sa vyjadruje v jednotkách sústavy SI (nkat) a hodnota variačného koeficientu je bežná pri metódach tohto

Tabuľka 2. Celková celulolytická aktivita FPA stanovená modifikovanou metódou IUPAC [8]
Table 2. Total cellulolytic activity as Filter Paper Activity FPA determined by IUPAC modified method [8]

	Enzým ¹	Aktivita ²		Variačný koeficient ³ [%]
		[nkat · g ⁻¹]	[nkat · ml ⁻¹]	
1	Phylacel	620	—	—
2	Cellulase Sigma	174	—	—
3	Cellulase Serva	3053	—	—
4	Celulóza SAV (D. Krupá)	1043	—	$\pm 7,9$
5	Celulóza SAV P20/86	885	—	$\pm 6,2$
6	Celulóza VÚPP (D. Krupá)	634	—	—
7	Celulóza VÚPP (Praha)	575	—	—
8	Celluclast Novo	—	1330	$\pm 10,6$
9	Celulóza (Kolín 89)	—	139	$\pm 9,4$

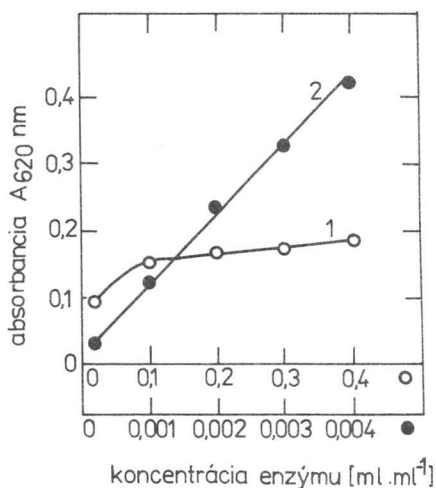
1 Enzyme, 2 Activity, 3 — Coefficient of variation.

typu. Metódu stanovenia celkovej celulolytickej aktivity FPA možno prijať pre špecifikáciu enzýmov bez úprav.

Z praktického hľadiska je ďalej výhodné, že stanovenie celkovej celulolytickej aktivity FPA, ako aj C_x -aktivity možno pri použití modifikovaných metód IUPAC urobiť súbežne podobným postupom s kyselinou 3,5-dinitrosalicylvou a rozdielnym substrátom.

Uplatnenie chromolytických *S*-testov

Pre stanovenie aktivity celuláz sa overovali 2 typy chromolytických testov, ktoré vyvíjali a ponúkali niektorí výrobcovia, a to *S*-testy celuláza celková a *S*-testy celuláza C_x z JZD Slušovice a JRD Lehnice. *S*-testy celuláza celková sa overovali pri stanovení aktivity enzýmu Celluclast Novo, ktorý obsahuje tak exo- ako aj endo-1,4- β -glukanázovú aktivitu, a to za podmienok hydrolyzy 37°C, pH 4,8 a času inkubácie 1 hodina. Pri oboch *S*-testoch celuláza celková sa však dosiahli merateľné hodnoty absorbancie len pri neprimerane vysokých koncentráciách enzýmového roztoku (cca 0,1 ml enzýmu \cdot ml⁻¹), pričom závislosti absorbancie od koncentrácie roztoku enzýmu boli výrazne nelineárne. Ani



Obr. 2. Koncentračná závislosť absorbancie supernatantu pri stanovení aktivity enzýmového roztoku Celluclast Novo *S*-testom celuláza C_x pochádzajúcim od dvoch výrobcov: 1 — JZD Slušovice, 2 — JRD Lehnice.

Fig. 2. Concentration behaviour of supernatant absorbance for determination of activity of enzyme solution Celluclast Novo by chromolytic *S*-test cellulase C_x originating with 2 producers: 1 — Cooperative Farm Slušovice, 2 — Cooperative Farm Lehnice.

predĺžením času hydrolýzy sa nedosiahol lineárny priebeh koncentračnej závislosti, takže nie je možné vypočítať aktivitu. Z výsledkov laboratórneho overovania vyplynulo, že analyzované výrobné šarže *S*-testu celulóza celková neboli ešte technicky doriešené pre exaktné stanovenie aktivity.

Pri overovaní druhého typu *S*-testu celulóza C_x sa rovnaký problém nelineárnej koncentračnej závislosti absorbancie farebného roztoku po hydrolýze substrátovej tablety prejavil len pri *S*-teste z JZD Slušovice. *S*-test celulóza C_x z JRD Lehnice naproti tomu túto chybu nevykazoval, závislosť absorbancie od koncentrácie enzýmu bola lineárna a dosiahla sa vyhovujúca farebná reakcia s enzýmovým roztokom pri koncentrácii enzýmu 100-krát nižšej ako pri *S*-teste celulóza C_x z JZD Slušovice (obr. 2). *S*-testom celulóza C_x z JRD Lehnice sa urobili analýzy 5 rôznych vzoriek celulytických enzýmov, určili sa oblasti linearity merania (pri všetkých vzorkách je oblasť linearity v rozsahu absorbancie od 0 do 0,5) a vypočítali sa aktivity (tab. 3).

Tabuľka 3. Aktivita celulytických enzýmov, stanovená *S*-testom celulóza C_x (JRD Lehnice)
Table 3. Activity of cellulolytic enzymes, determined by *S*-test cellulase C_x (Cooperative Farm Lehnice)

	Enzým ¹	Relatívna aktivita ² (37°C, pH 4,8)	
		[u · g ⁻¹]	[u · ml ⁻¹]
1	Cellulase Serva	2430	—
2	Celulóza SAV P20/86	3710	—
3	Celulóza VÚPP (Praha)	5100	—
4	Celluclast NOVO	—	4100
5	Celulóza (Kolín 89)	—	780

1 — Enzyme, 2 — Relative activity.

Pri vzorke Celluclast sa stanovila reprodukovateľnosť metódy v štyroch sériách analýz a vypočítal sa variačný koeficient $\pm 4\%$. Z porovnania hodnôt nameranej relatívnej aktivity *S*-testom celulóza C_x s hodnotami C_x -aktivity stanovenými napríklad sacharogénnou metódou podľa VÚPP pri uvedených 5 vzorkách enzýmov však nevyplýva jednoznačnosť možnosti prepočtu medzi oboma postupmi pre rôzne enzýmy. Okrem rozdielov v použitom substráte a konkrétnych reakčných podmienkach môže byť tento fakt spôsobený prítomnosťou rôznych vedľajších enzýmových aktivít (napr. podľa zdroja enzýmu), v dôsledku čoho je aj ich konečný účinok nerovnaký.

Z výsledkov práce vyplynulo, že len *S*-test celulóza C_x z JRD Lehnice je vhodný na stanovenie C_x -aktivity a v danej etape vývoja uplatniteľný napríklad pri sledovaní nárastu aktivity pri produkcii enzýmu a podobne.

Literatúra

1. RUTTLOFF, H.—HUBER, J.—ZICKLER, F.—MANGOLD, H. K.: Industrielle Enzyme. Leipzig VEB, Fachbuchverlag 1978.
2. BERGMEYER, H. U.: Methods of Enzymatic Analysis. Volume IV — Enzymes 2. Weinheim, Verlag Chemie 1984.
3. WISEMAN, A.: Příručka enzymové technologie. Praha, SNTL 1980.
4. Measurement of Cellulase Activities, Commission on Biotechnology IUPAC. Indian Institute of Technology, New Delhi, 1984.
5. Návodý analytických metod v enzymologii. Praha, VÚPP 1978.
6. Serva, Fine Biochemicals. Heidelberg, Delivery Program 1988/89.
7. Firemná literatúra: Novo Industri, Analytical Method, Cellulase Determination, 1982.
8. FARKAŠ, V.: Metodika stanovenia enzýmů celulóзовého komplexu. Bratislava, Chemický ústav SAV, 1989.
9. Specifications for identity and purity. FAO Food and Nutrition Paper, No. 38, Rome, 1988.
10. Enzympräparate, Standards für die Verwendung in Lebensmitteln. Hamburg, B. Behrs Verlag, 1983.
11. Firemná literatúra: Quest International, Holand: Bestimmung der β -1,4-Glucanase-Aktivität, 1989.
12. Firemná literatúra: S-test celulóza. JZD Agrogen Slušovice, 1989.
13. Firemná literatúra: Návod na stanovenie β -1,4-glukanázovej aktivity. JRD Agrokombinát Lehnice, 1989.

Do redakcie došlo 31. 10. 1991

Main cellulolytic enzymes activity determination in food and feed enzyme preparations

Summary

In order to specify enzyme preparations applied to food and feed industry, investigation and selection of methods for determination of activity of main cellulolytic enzymes from cellulolytic complex were carried out. Experimentally, three types of procedures were verified: endoglucanase activity determination (C_x -activity), FPA (Filter Paper Activity) method and chromolytic S-tests for total cellulase and C_x -cellulase. Results obtained by verification of a set of enzyme preparation samples indicate that for the purpose of cellulolytic enzymes specification, modified procedures recommended by Biotechnology Commission of IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) are suitable.

Определение активности основных целлюлолитических ферментов в пищевых и кормовых ферментных препаратах

Резюме

Для целей спецификации ферментных препаратов применяемых в пищевой и кормовой промышленности было сделано исследование и подбор методов определения активности основных частей ферментов целлюлолитического комплекса. Экспериментально были проверены три типа методов: определение эндоглюконазовой активности (C_{α} -активность); метод FPA (Filter Paper Activity) и хромолитические S-тесты для общей целлюлазы и целлюлазы C_{α} . Из результатов проверки ряда проб ферментных препаратов выходит, что для целей спецификации целлюлолитических ферментов подходящими являются модифицированные методы, которые рекомендует Комиссия для биотехнологии при IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).