

Stanovenie aktivity α -amylázy v enzýmových preparátoch

EDITA DUDÍKOVÁ – JÚLIUS ŠUBÍK

Súhrn. Robil sa prieskum a výber metód na stanovenie aktivity α -amylázy s osobitným zreteľom na štandardizáciu metód na analýzu priemyslových enzýmových preparátov. Experimentálne sa overovali metódy zakladajúce sa na meraní sfarbenia jódškrobového komplexu po hydrolýze škrobového substrátu α -amylázou, a to dvojakého typu: bez použitia β -amylázy na úpravu substrátu a s použitím nadbytku β -amylázy na prípravu α -amylodextrínu. Ďalej sa overovali metódy s farebne označenými nerozpustnými substrátmi. Z výsledkov vyplynulo, že v rámci štandardizácie analytických postupov pre enzýmové preparáty je najvhodnejšia metóda SKB (Sandstedt–Kneen–Blish).

α -Amyláza (1,4- α -D-glukán glukanohydroláza), EC 3.2.1.1., katalyzuje hydrolýzu α -1,4 glukánových väzieb za tvorby vyšších oligosacharidov a maltózy. Rozlišujú sa amylázy rastlinné, zvieracie, ľudské a mikrobiálne. α -Amylázy sú endoamylázy, ktoré hydrolyzujú vysokomolekulové substráty, ako sú škrob, amylóza alebo glykogén, zväčša na ľubovoľných miestach vnútri molekuly škrobu a produkujú polysacharidy s kratším reťazcom, t. j. dextríny a ďalej až maltózu. Aj keď α -amylázy sú stabilné a dajú sa ľahko purifikovať, meranie ich aktivity je komplikované pre rôznosť reakčných mechanizmov, rôznorodosť zmesí produktov a nedostatok substrátov s definovanou chemickou štruktúrou [1].

Pri deklarovaní aktivity α -amylázy používajú rôzni autori a výrobcovia enzýmových preparátov jednotky a definície aktivity, ktoré sú najvhodnejšie pre ich prácu, ale veľmi sa od seba odlišujú čo do použitého substrátu, pH, teploty atď. V záujme lepšieho dorozumenia v oblasti enzýmovej analýzy sústreďuje sa pozornosť popredných odborníkov na prednosti štandardizácie, t. j. jednotného použitia nomenklatúry symbolov, veličín a jednotiek v zmysle medzinárodného systému jednotiek SI (System International).

Ing. Edita Dudíková, RNDr., Július Šubík, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

V sústave SI sa definuje jednotka enzýmovej aktivity 1 katal (kat), čo je enzýmová aktivita, ktorá premení 1 mol substrátu za 1 sekundu. Reakcia prebieha pri teplote 30 °C, optimálnom pH a koncentrácii substrátu, ktoré sú presne definované. Jednotka katal nahrádza predtým zavedenú medzinárodnú jednotku U (unit) z roku 1961, ktorá je definovaná: 1 U je množstvo enzýmu, ktoré katalyzuje premenu 1 μ mol substrátu za 1 minútu. Obe jednotky sa prepočítavajú podľa vzťahu $1 \text{ kat} = 6 \cdot 10^4 \text{ U}$, alebo naopak, $1 \text{ U} = 16,67 \text{ nkat}$.

Cieľom šandardizácie je aj zdokonaľovanie spoľahlivosti a reprodukovateľnosti meracích metód na dosiahnutie porovnateľnosti výsledkov medzi rôznymi laboratóriami. V oblasti enzýmových preparátov sa touto problematikou na medzinárodnej úrovni zaoberá Výbor expertov FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) pre potravinárske aditíva, ktorý spracúva a odporúča špecifikácie pre jednotlivé enzýmové preparáty. Súčasťou špecifikácií sú okrem požiadaviek na presné vymedzenie kvality aj odporúčané skúšobné postupy, ktoré obsahujú aj metódy stanovenia aktivity enzýmových preparátov. Napriek týmto zjednocujúcim trendom používajú poprední výrobcovia enzýmových preparátov vo svete naďalej zaužívané neoficiálne jednotky, vhodné predovšetkým z aplikačného hľadiska.

Na stanovenie aktivity α -amylázy sa v literatúre vyskytuje veľký počet metód, ktoré sú založené na rôznych princípoch.

Klasické metódy sú založené na:

- meraní množstva redukujúcich skupín uvoľnených enzýmovou reakciou,
- meraní poklesu intenzity sfarbenia jódškrobového komplexu,
- meraní poklesu viskozity škrobovej suspenzie pri enzýmovej hydrolýze.

Modernejšie metódy sú:

- kolorimetrické s farebne označenými nerozpustnými polysacharidmi,
- turbidimetrické, nefelometrické a polarografické s vysokomolekulovými substrátmi,
- spektrofotometrické metódy s nízkomolekulovými definovanými substrátmi [1–3].

Z hľadiska stanovenia aktivity priemyselne vyrábaných enzýmov v súvislosti s ich aplikáciou v potravinárskom priemysle sú ako štandardné zavedené a rozpracované predovšetkým prvé dva typy klasických metód [4, 5].

Z metód prvého typu je najvýznamnejšia metóda stanovenia amylolytickej aktivity podľa Bernfelda [6], založená na oxidácii karbonylových skupín maltózy, vytvorenej pôsobením amylolytického enzýmu na škrobový substrát, kyselínou 3,5-dinitrosalicylvou. Keďže reduktometrické stanovenie aktivity je málo špecifické [4, 7], uplatňuje sa táto metóda predovšetkým v experimen-

tálnych prácach [8] a pri analýze preparátov vyššieho stupňa čistoty. Popredný výrobca biochemikálií, firma Serva, cituje túto metódu pri deklarovaní aktivity svojich enzýmových preparátov [9].

Do tejto skupiny patrí aj metóda podľa Somogyiho [10], založená na stanovení vytvorených redukujúcich cukrov Somogyiho–Nelsonovým reagensom [11].

Druhý typ klasických metód, využívajúcich na stanovenie aktivity α -amylázy farebné zmeny jódškrobového komplexu v dôsledku hydrolýzy substrátu, je najviac rozšírený a v literatúre sa opisujú viaceré modifikácie vychádzajúce zo základného princípu. Modifikácie sa v zásade týkajú použitia β -amylázy na úpravu substrátu.

Medzi metódy, ktoré neupravujú substrát β -amylázou, možno zaradiť metódu uvádzanú v podnikovej norme Slovenských škrobární pre potravinársku bolamylázu [12]. V zmysle tejto normy sa stanovuje dextrinačná aktivita DA α -amylázy meraním času potrebného na odbúranie škrobu roztokom amylolytického preparátu na vysokomolekulové dextríny. Meria sa čas potrebný na dosiahnutie štandardného sfarbenia jódškrobového roztoku pri teplote 30 °C a pH 6,2. Na rovnakom princípe sa zakladá modifikovaná metóda podľa Wohlgemutha [13], líši sa však odlišnými reakčnými podmienkami a definovaním jednotky aktivity. Na vyhodnotenie sfarbenia sa používa Helligov komparátor s referenčným farebným štandardom, t. j. α -amylázovým farebným diskom. Metódu podľa Wohlgemutha používa pre svoje výrobky napr. holandská firma Jan Dekker alebo nemecká firma Miles-Kali-Chemie [14]. Sovietsky enzýmový priemysel má k dispozícii akostnú normu na stanovenie aktivity amylolytických enzýmov mikrobiálneho pôvodu [15], ktorá takisto neupravuje substrát β -amylázou. Jódškrobové sfarbenie po hydrolýze škrobu na dextríny rôznej molekulovej hmotnosti sa vyhodnocuje spektrofotometrickým meraním oproti kontrole bez enzýmu.

Do skupiny metód, ktoré využívajú nadbytok β -amylázy na úpravu substrátu, patria rôzne modifikácie metódy SKB nazvanej podľa pôvodných autorov Sandstedta, Kneena a Blisha [16]. Metóda SKB sa zakladá na meraní času potrebného na dosiahnutie štandardného poklesu jódškrobového sfarbenia inkubačnej zmesi za prítomnosti nadbytku β -amylázy. Sfarbenie sa vyhodnotí porovnaním so štandardným roztokom podľa Hagberga. Túto metódu detailne opisujeme v časti Materiál a metódy, keďže zaujíma významné miesto medzi metódami na stanovenie aktivity α -amylázy. Firma Serva napr. uvádza aktivitu preparátov α -amylázy okrem jednotiek U aj v jednotkách SKB, čo umožňuje jednak vzájomný prepočet medzi jednotkami, ako aj priame overenie metódy na štandardnom preparáte s deklarovanou aktivitou. Metóda SKB bola zaradená ako odporúčaná metóda aj do štandardov pre potravinárske enzýmové preparáty v NSR [17]. Najvýznamnejšie však je, že metódu

SKB prevzali špecialisti FAO a WHO na stanovenie aktivity bakteriálnej a fungálnej α -amylázy [18, 19] a odporúčania FAO/WHO by sa mali rešpektovať aj pri komplexnej analytickej špecifikácii enzýmov u nás.

Z novších metód sa v posledných rokoch venuje pozornosť rýchlym metódam využívajúcim farebne označené nerozpustné substráty. Sú ďalším pokrokom vo vývoji štandardizačných analytických postupov, pretože špecifické substráty, ako farebne označená amylóza a škrob, umožňujú rýchle a jednoduché postupy a poskytujú citlivú reakciu [3].

Tento princíp aplikovala u nás firma Lachema vo svojom výrobku „Bio-La-Test alfa-amyláza“ určenom na stanovenie aktivity α -amylázy v sére a moči, ako aj firma Slovakoфарма v klinickom teste „Spofa test α -amyláza“ [20, 21]. Testovacie tablety týchto prípravkov obsahujú nerozpustný sieťovaný škrob s kovalentne viazaným farbivom. Zo zahraničných výrobcov napr. firma Sigma dodáva dva typy testov s rozdielnymi substrátmi [22].

Z hľadiska vzrastajúceho používania mikrobiálnych amyláz v potravinárskom priemysle má perspektívy na uplatnenie „S-test amyláza univerzál“ vyrobený v Chemických závodoch Juraja Dimitrova. Je vhodný na sledovanie zmien aktivity α -amylázy počas fermentácie a v izolačných postupoch, najmä v pivovarníctve. Substrátom je nerozpustný škrob s naviazaným farbivom, zloženie tablety je prispôbené použitiu pre obilniny. Pri analýze sa používa tlmivý roztok s pH optimálnym pre sledovaný enzým.

Okrem chromogénnych nerozpustných substrátov sa vyvíjajú aj nové rozpustné chromogénne substráty, ktoré sa využívajú na stanovenie aktivity α -amyláz a detekciu ich rôznych foriem v géloch po elektroforéze a izoelektrickej fokusácii [25].

Najnovšie sa na stanovenie aktivity amyláz opisujú UV metódy, využívajúce špecifické nízkomolekulové substráty (maltotetraóza, maltoheptaóza a pod.) pre ich čistotu a možnosť presného určenia priebehu reakcie. Možno merať niekoľko reakčných produktov, napr. glukózu, glukóza-1-fosfát alebo 4-nitrofenol za spolupôsobenia vhodných pomocných enzýmov [1].

Cieľom tejto práce bol prieskum a výber metód na stanovenie aktivity α -amylázy s osobitným zreteľom na štandardizáciu metód na analýzu priemyslových enzýmových preparátov.

Materiál a metódy

V práci sa použili vzorky enzýmových preparátov zo Slovenských škrobární Dolná Krupá (potravinárska a technická α -amyláza z *Bacillus subtilis*, glukobatatín z *Aspergillus batatae*), firmy Jan Dekker Holand (Brew-N-zyme GPG-

L, Brew-N-zyme CGP 13, β -amylase), firmy Serva (α -Amylase Rohalase A3 z *B. subtilis*, ca 14 U/mg), firmy Novo Industri Denmark (Termamyl L-120 z *B. licheniformis*), JRD Mier Spišské Bystré (Bystrozym z *B. subtilis*). Väčšina chemikálií bola od firmy Lachema Brno, S-test amyláza univerzál (rok 1987) z CHZJD v Bratislave a rozpustný škrob od firmy Merck.

Analytické metódy a pracovné postupy:

Metóda podľa podnikovej normy pre potravinársku bolamylázu [12]. Stanovuje sa dextrináčna aktivita α -amylázy meraním času potrebného na odbúranie škrobu roztokom amylolytického preparátu na vysokomolekulové dextríny. Meria sa čas potrebný na dosiahnutie štandardného definovaného sfarbenia jódškrobového roztoku za špecifických podmienok reakcie.

Definícia – jednotka dextrináčnej aktivity (DA) je množstvo enzýmu potrebné na premenu 1 mg škrobu na vysokomolekulové dextríny za 1 minútu reakcie za podmienok skúšky.

Enzýmová reakcia prebieha pri 30 °C v 10 ml škrobového roztoku (20 g/l) upraveného boritanovým tlmivým roztokom (11,3 g KH_2PO_4 a 3,3 g tetraboritanu sodného/l) s pH 6,2 po pridaní 5 ml roztoku enzýmového preparátu vhodne zriedeného roztokom NaCl (10 g/l). Po 10 minútach reakcie sa každú minútu odoberá 1 ml reakčnej zmesi do série skúmaviek s roztokom jódu. Čas, keď je sfarbenie jódového roztoku s reakčnou zmesou rovnaké ako sfarbenie štandardu (0,125 g Saturnovej hnedej LBR v 1 l H_2O), je presný čas dextrinácie; zistí sa vizuálne alebo meraním absorbancie pri 555 nm.

Výpočet:

$$\text{DA/g} = \frac{40\,000}{c \cdot T}$$

kde c je koncentrácia enzýmu (g/l), T – čas, za aký sa dosiahne sfarbenie štandardu (min).

Modifikovaná metóda podľa Wohlgemutha [13]. Skúška sa zakladá na meraní času potrebného na to, aby preparát α -amylázy hydrolyzoval rozpustný škrobový substrát na dextríny definovanej veľkosti – určitého stupňa. Stupeň dextrinácie indikuje farba dextrínovo-jódového komplexu.

Definícia – jedna modifikovaná Wohlgemuthova jednotka (MWU) je množstvo enzýmu, ktoré dextrinuje 100 mg rozpustného škrobu na určitý stupeň dextrinácie za 30 minút za podmienok skúšky. Enzýmová reakcia prebieha pri 40 °C v zmesi 5 ml škrobového substrátu s optimálnym pH (20 g/l), 4 ml destilovanej vody a 1 ml enzýmového preparátu zriedeného tak, aby sa dosiahol čas dextrinácie 5 až 25 min. Po 5 minútach reakcie sa každú minútu odoberá 1 ml reakčnej zmesi do série skúmaviek s 5 ml roztoku jódu. Farba dextrínovo-jódového komplexu sa porovnáva s farbou α -amylázového farebného disku (α -Amylase Color Disk, fy Hellige) alebo s farebným štandardom

obsahujúcim 25 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 3,84 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ v 100 ml roztoku HCl (0,01 mol/l). Zaznačí sa čas, keď farba vzorky sa rovná farbe štandardu.

Metóda zohľadňuje pôvod α -amylázy na určenie optimálneho pH:

bakteriálna – fosfátový tlmivý roztok pH 5,4,

fungálna – acetátový tlmivý roztok pH 5,0,

pankreatická – fosfátový tlmivý roztok pH 6,9.

Výpočet:

$$\text{MWU} = \frac{3\,000}{W \cdot T}$$

kde W je množstvo enzýmu v 1 ml alikvóte (g); T – čas, za aký dosiahne sfarbenie štandardu (min).

Metóda podľa sovietskej normy GOST [15].

Definícia: Jednotka aktivity amylolytických enzýmov (AS) je množstvo enzýmu, ktoré za určených podmienok, teploty a pH katalyzuje hydrolýzu 1 g rozpustného škrobu za 1 hodinu na dextríny rôznej molekulovej hmotnosti, čo reprezentuje 30 % škrobu prítomného v reakcii.

Enzýmová reakcia prebieha pri 30 °C v 10 ml roztoku škrobu (10 g/l) upravenom acetátovým tlmivým roztokom (1 mol/l) s pH 4,7 po pridaní 5 ml roztoku enzýmu, ktorý musí obsahovať enzým v množstve potrebnom na hydrolýzu 20–70 % škrobu. Popri skúšobnej reakčnej zmesi sa zaradi do pokusu aj kontrola, ktorá obsahuje namiesto vzorky enzýmu destilovanú vodu. Po 10 min sa preniesie 0,5 ml zo skúšobnej aj kontrolnej reakčnej zmesi do dvoch baniek s 50 ml roztoku jódu. Meria sa absorbancia pri 656 nm; rozdiel medzi skúšobným a kontrolným roztokom zodpovedá množstvu zhydrolyzovaného škrobu.

Výpočet pre preparáty:

$$\text{– bakteriálne: AS/g} = \frac{5,885 \cdot C + 0,001\,671}{n} \cdot 1000,$$

$$\text{– fungálne: AS/g} = \frac{7,264 \cdot C - 0,037\,88}{n} \cdot 1000,$$

kde C je množstvo zhydrolyzovaného škrobu,

$$C = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \cdot 0,1.$$

D_1 , D_2 sú absorbancie kontrolného a skúšobného roztoku,

n – množstvo enzýmového preparátu v 5 ml roztoku enzýmu (mg),

5,885, 0,001671, 0,3766, 7,264 – koeficienty získané pri matematickom vyhodnotení experimentálnych údajov závislosti množstva zhydrolyzovaného škrobu od množstva enzýmu; zahŕňajú aj prepočet na 1 hodinu pôsobenia enzýmu.

Metóda podľa FAO/WHO [19]

Metóda je založená na meraní času potrebného na dosiahnutie štandardného stupňa hydrolýzy škrobového roztoku v prítomnosti β -amylázy pri 30 °C. Stupeň hydrolýzy sa určí porovnaním jódového sfarbenia hydrolyzáta s farebným štandardom.

Definícia – jedna α -amylázová dextrinačná jednotka (DU) je množstvo α -amylázy, ktoré dextrinuje rozpustný škrob v prítomnosti nadbytku β -amylázy rýchlosťou 1 g/h pri 30 °C. Enzymová reakcia prebieha pri 30 °C v zmesi 20 ml substrátu s pH 4,8 a 5 ml vhodne zriedeného roztoku enzýmu vo vode. Substrátom je roztok amylodextrínu pripravený pôsobením β -amylázy v množstve 0,5 g/l na škrobový roztok (20 g/l), upravený acetátovým tlmivým roztokom (4 mol/l) s pH 4,8, počas 24 hodín pri 30 °C. V presných časových intervaloch (1 min) sa preniesie po 1 ml reakčnej zmesi do série skúmaviek s 5 ml zriedeného jódového roztoku a po premiešaní sa porovná sfarbenie so štandardom vizuálne alebo spektrofotometricky pri 620 nm. Štandardom je Alpha-Amylase Colour Disk alebo farebný štandard pripravený rozpustením 25 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 3,84 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ v 100 ml HCl (0,01 mol/l). Čas, pri ktorom je sfarbenie vzorky rovnaké ako sfarbenie štandardu, použije sa vo výpočte aktivity. Výpočet:

$$\text{DU/g} = \frac{24}{W \cdot T}$$

kde W je množstvo enzýmu v 5 ml alikvóte (g), T – dextrinačný čas (min).

Metóda SKB – podľa Sandstedta, Kneena a Blisha [16]

Metóda je založená na meraní času potrebného na štandardný pokles jód-škrobového sfarbenia inkubačnej zmesi za prítomnosti nadbytku β -amylázy. Princíp spočíva v schopnosti α -amylázy dextrinovať škrob do odfarbenia jód-škrobového sfarbenia v dôsledku vznikajúcich dextrínov. Sfarbenie sa porovnáva so štandardom.

Definícia – 1 jednotka SKB je množstvo enzýmu, ktoré hydrolyzuje 1 g rozpustného škrobu za 1 hodinu pri 30 °C za prítomnosti β -amylázy.

Enzymová reakcia prebieha pri 30 °C v zmesi 30 ml riedenej vzorky enzýmu a 10 ml roztoku α -amylodextrínu, ktorého pH sa upravilo na hodnotu optimálnu pre enzym. Roztok α -amylodextrínu sa pripraví pôsobením β -amylázy na škrobový roztok rovnako ako pri predchádzajúcom postupe alebo použitím β -amylázy extrahovanej z múky. V časových intervaloch (1 min) sa odoberá po 4 ml reakčnej zmesi do série skúmaviek s 4 ml zriedeného jódového roztoku a vizuálne sa porovná farba so štandardom. Štandardom je Seturnova hnedá (10 g/l) alebo roztok podľa Hagberga, pripravený rozpustením 19,25 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,576 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ a 2,565 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ v 100 ml HCl (0,01 mol/l). Dextrinácia má trvať 10 až 30 minút.

Výpočet:

$$\text{SKB/g} = \frac{400}{T \cdot c}$$

kde T je čas dextrinácie (min), c – koncentrácia enzýmu (g/l).

S-test amyláza univerzál [24]

Tabletový test obsahuje nerozpustný chromolytický substrát na báze škrobu, ktorý sa rozpúšťa účinkom α -amylázy.

Definícia: jedna jednotka aktivity u je relatívna aktivita vyjadrená v mg substrátu premeneného za 1 hodinu. K 1 ml vhodne zriedeného enzýmu v tlmivom roztoku s pH optimálnym pre analyzovaný enzýmový preparát, vytemperovanom na požadovanú teplotu (30 °C), pridá sa 1 tableta testu a inkubuje sa 15 minút. Súčasne sa inkubuje reakčná zmes pre blank, ktorá namiesto enzýmového roztoku obsahuje tlmivý roztok. Reakcia sa skončí pridaním 3 ml zastavovacieho roztoku (10 g Na_2CO_3 + 100 ml acetónu v 1 l H_2O) a po odcentrifugovaní sa meria absorbancia supernatantu pri 620 nm.

Výpočet relatívnej aktivity α -amylázy:

$$u/l = \frac{160 A_{\text{vz}} k fr}{A_T}, \text{ resp. } u/g = u/l \cdot 10^{-3},$$

kde A_{vz} je absorbancia vzorky, A_T – absorbancia zodpovedajúca úplne hydrolyzovanému substrátu (pre každú šaržu udáva výrobca), fr – faktor riedenia enzýmového roztoku, k – faktor množstva enzýmového roztoku použitého na meranie (podľa tabuľky v návode).

Výsledky a diskusia

Metódy používajúce substrát bez úpravy β -amylázou. V našej práci sa ako východisková overovala metóda stanovenia aktivity α -amylázy postupom používaným pri fermentačnej výrobe bakteriálnej α -amylázy podľa podnikovej normy Slovenských škrobární, n. p., Trnava pre potravinársku bolamylázu. K metódam tohto typu parí aj modifikovaná metóda podľa Wohlgemutha, ktorú rôzni zahraniční výrobcovia používajú pri špecifikácii bakteriálnej a fungálnej α -amylázy [13, 14]. Princíp oboch metód, ako aj postup pri enzýmovej reakcii, zloženie substrátu a jódového roztoku sú rovnaké. Rozdiely sú predovšetkým v tom, že pri modifikovanej Wohlgemuthovej metóde prebieha hydrolýza škrobu pri teplote o 10 °C vyššej, t. j. 40 °C, intenzita sfarbenia porovnávacieho štandardného roztoku je o niečo vyššia a jednotky aktivity sa definujú rozdielnym spôsobom. Oboma metódami sa analyzovalo 7 vzoriek

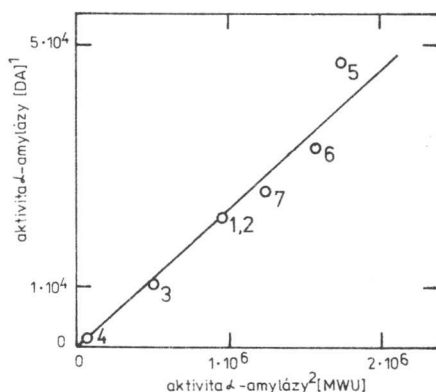
enzýmových preparátov (tab. 1). Vzťah medzi hodnotami aktivít nameraných týmito metódami znázorňuje obr. 1 a dovoľuje vzájomný prevod jednotiek aktivít podľa vzorca $1 \text{ DA} = 44,8 \text{ MWU}$. Pri enzýmovom preparáte Brew-N-zyme GPG-L bolo možné porovnať nameranú hodnotu aktivity s údajom výrobcu, podľa ktorého je aktivita α -amylázy štandardizovaná na hodnotu $1365 \text{ 000 MWU/ml} \pm 5 \%$. Rozdiel medzi nameranou aktivitou je úmerný orientačnému charakteru údajov výrobcu a svedčí o dobrej reprodukovateľnosti overovanej metódy.

T a b u l k a 1. Porovnanie výsledkov stanovenia aktivity α -amylázy rôznymi metódami bez použitia nadbytku β -amylázy

T a b l e 1. Comparison of α -amylase activity determined by various methods without using an excess of β -amylase

Č. ¹	Enzýmový preparát (aktivita podľa výrobcu) ²	Metóda ³					
			PN bol- amyláza ⁴		Modifikovaná Wohlgemuthova ⁵	Sovietska norma ⁶	
		pH	[DA/g]	pH	[MWU/g]	pH	[AS/g]
1	Potravinárska α -amyláza ⁷ (24 000 DA/g)	6,2	21 000	5,6	970 000	4,7 6,2	nemerat. ¹⁰ 1 150
2	Potravinárska α -amyláza (20 000 DA/g)	6,2	20 000	5,6	940 000	4,7 6,2	nemerat. ¹⁰ 1 180
3	Technická α -amyláza ⁸ (6060 DA/g)	6,2	10 000	5,6	500 000		—
4	Glukobatin ⁹ (118,5 DA/g)	4,7	690	5,6	46 000		—
5	α -Amylase Rohalase A3 SERVA (14 U/mg)	5,7	46 400	5,6	1 760 000		—
6	Brew-N-zyme GPG-L (1 365 000 MWU/ml)	5,7	32 400	5,6	1 580 000		—
7	Brew-N-zyme CGP 13 (neuvedená)	5,7	25 500	5,6	1 250 000		—

¹No.; ²Enzym preparation (activity according to manufacturer); ³Method; ⁴Producer standard bo-
lamylase; ⁵Wohlgemuth modified; ⁶soviet standard; ⁷Food α -amylase; ⁸Technical α -amylase;
⁹Glucobatine; ¹⁰Unmeasurable.



Obr. 1. Relácia hodnôt aktivity α -amylázy rôznych enzýmových preparátov nameraných modifikovanou Wohlgemuthovou metódou a postupom podľa PN pre bolamylázu. 1, 2 – potravinárska α -amyláza, 3 – technická α -amyláza, 4 – glukobatatín, 5 – α -Amylase Serva, 6 – Brew-N-zyme GPG-L, 7 – Brew-N-zyme CGP 13.

Fig. 1. Relation of α -amylase activity values for various enzyme preparations, measured by modified Wohlgemuth method and by procedure according to the producer standard for bolamylase. 1, 2 – food α -amylase, 3 – technical α -amylase, 4 – glucobatatine, 5 – α -Amylase Serva, 6 – Brew-N-zyme GPG-L, 7 – Brew-N-zyme CGP 13. (¹ α -Amylase activity (DA); ² α -Amylase activity (MWU).)

Ďalej sa orientačne overovala metóda stanovenia amylolytickej aktivity podľa sovietskej normy pre enzýmové preparáty [15]. V súvislosti s plánom tvorby noriem RVHP sa v Sovietskom zväze rieši návrh normy na stanovenie amylolytickej aktivity a dá sa očakávať, že nový návrh normy bude vychádzať z pôvodnej zväzovej normy. Pozitívnym prvkom tejto metódy je spektrofotometrický spôsob vyhodnocovania intenzity sfarbenia hydrolyzátu po enzýmovej reakcii vzhľadom na podiel zhydrolyzovaného škrobu. Tento postup nie je zaťažovaný subjektívnou chybou vizuálneho porovnania sfarbenia tak ako pri oboch predchádzajúcich metódach. Nedostatkou postupu je, že metóda neakceptuje rozdielnosť optimálneho pH počas hydrolýzy substrátu pre bakteriálne a fungálne preparáty. Acetátový tlmivý roztok s pH 4,7 sa používa pre bakteriálne i fungálne preparáty, čo je pre bakteriálne α -amylázy hlboko pod optimálnym pH. Na výpočet aktivity sa uvádzajú vzorce osobitne pre bakteriálne a fungálne preparáty, ktoré obsahujú experimentálne zistené číselné koeficienty. Tento postup sa overil na stanovenie aktivity vo vzorke bakteriálnej α -amylázy. V sérii reakčných zmesí s obsahom enzýmového preparátu v rôznych koncentráciách nedošlo k hydrolýze substrátu ani pri aplikácii enzýmu v najvyššej koncentrácii do tej miery, že by sa dosiahli merateľné hodnoty. Po úprave pH na hodnotu optimálnu pre daný enzým, t. j. pH 6,2, škrob hydrolyzoval a intenzita sfarbenia hydrolyzátu bola úmerná koncentrácii en-

zýmového roztoku v reakčnej zmesi. Aktivita α -amylázy (tab. 1) sa vypočítala použitím vzorca pre bakteriálne preparáty. Zostáva však sporné, nakoľko je použitie číselných koeficientov vo vzorci správne, keď sa zmenili reakčné podmienky, t. j. pH reakčnej zmesi.

Metódy používajúce substrát s nadbytkom β -amylázy. Vzhľadom na požiadavku akceptovať medzinárodne uznávané postupy pri analýze enzýmových preparátov s cieľom ich komplexnej analytickej špecifikácie sme experimentálne overovali metódy stanovenia aktivity α -amylázy odporúčané v rámci FAO/WHO. Na stanovenie aktivity bakteriálnej α -amylázy sa prevzala a doslovne sa opisuje metóda na stanovenie aktivity v slade [19] bez uvedenia pH tlmivého roztoku pre enzýmovú reakciu. Namerané pH tlmivého roztoku je 4,6, čo je nevhodne nízka hodnota pre bakteriálne preparáty; túto metódu sme prakticky nepoužili.

Ďalšou metódou odporúčanou FAO/WHO je metóda stanovenia aktivity fungálnej α -amylázy [18, 19]. Hoci v postupe nie je uvedený odkaz na pôvodný literárny prameň, jednako je táto metóda v podstate klasická metóda SKB [16]. Pri tomto type metód sa k substrátu najskôr pridá prebytok β -amylázy na odbúranie škrobu do tej miery, aby sa prípadne prítomná β -amyláza v analyzovanom preparáte α -amylázy nemohla prejaviť odbúraním škrobu [4]. Zavedenie tejto metódy predpokladalo mať k dispozícii špeciálny preparát β -amylázy bez prítomnosti α -amylázy. Náhrada preparátu β -amylázy sa riešila podľa metódy SKB, ktorú modifikoval Výzkumný ústav potravinárského priemyslu v Prahe [16]. Využíva upravený extrakt β -amylázy z múky. Ako druhý variant náhrady špeciálneho preparátu β -amylázy sa overila možnosť použiť kvapalný preparát β -amylázy firmy Jan Dekker. Experimentálne sa potvrdila nevyhnutnosť inaktivácie stôp α -amylázy v kvapalnom preparáte kyselinou octovou a stanovila sa najvhodnejšia koncentrácia β -amylázy na prípravu amyloextrínu. Obidve modifikácie (FAO/WHO a SKB) sa podrobne porovnali teoreticky i experimentálne; rozdiely sú minimálne a zohľadnia sa pri výpočte aktivity; jednotky aktivity sú definované rovnako. S využitím oboch metód sa analyzovalo 9 vzoriek preparátov α -amylázy (tab. 2), ale na rozdiel od týchto metód, pri ktorých sa uvádza stanovenie aktivity pri pH 4,8 upravovali sa hodnoty pH substrátov pred enzýmovou reakciou na pH optimálne pre konkrétne enzýmové preparáty, obdobne ako definuje podmienky firma Serva [9].

Z hľadiska reprodukovateľnosti metódy SKB je dôležité najmä zistenie, že pri štandardnom preparáte α -Amylase Rohalase firmy Serva sa namerala pri viacerých experimentoch rovnaká aktivita, akú deklaruje výrobca pre tento preparát v jednotkách SKB.

Vzhľadom na to, že metóda SKB je v súlade s požiadavkami FAO/WHO,

T a b u l k a 2. Porovnanie výsledkov stanovenia aktivity α -amylázy
rôznymi metódami

T a b l e 2. Comparison of α -amylase activity determined
by various methods

Č ¹	Enzymový preparát ²	pH	Metódy s nadbytkom β -amylázy ³		S-test amyláza univerzál ⁴ [<u>u</u> /g]
			FAO/WHO	SKB	
			[DU/g]	[SKB/g]	
1	Potravinárska α -amyláza I ⁵	6,2	–	13 300	7,3 · 10 ⁶
2	Potravinárska α -amyláza II -s kvapalnou β -amylázou ⁶	6,2	13 700	13 300 13 300	7,3 · 10 ⁶
3	Technická α -amyláza ⁷	6,2	–	6 100	3,9 · 10 ⁶
4	Glukobataatin ⁸	4,8	–	800	0,43 · 10 ⁶
5	α -Amylase Rohalase A3 Serva (18 000 SKB/g = = ca 14 U/mg)	5,7 4,9–6,1	18 400 –	18 000 Ø 19 000	11,4 · 10 ⁶
6	Brew-N-zyme GPG-L	6,2	–	17 100	9,3 · 10 ⁶
7	Brew-N-zyme CGP 13	6,2	–	16 800	9,2 · 10 ⁶
8	Termamyl L-120	6,0	–	445	2,5 · 10 ⁶
9	Bystrozym	6,0	–	3	5,2 · 10 ³

Definície medzinárodných jednotiek U a jednotky relatívnej aktivity u podľa S-testu sú uvedené v kapitole Materiál a metódy.

Definitions of international units U and of relative activity unit u according to S-test are mentioned in section Material and methods.

¹No.; ²Enzyme preparation; ³Methods with the excess of β -amylase; ⁴S-test amylase universal;

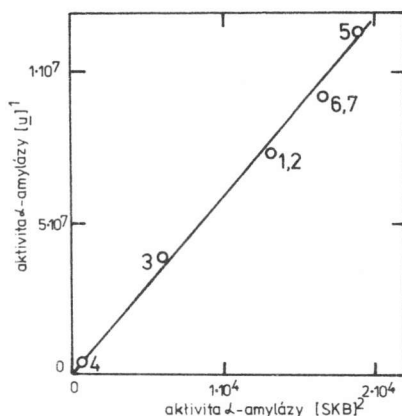
⁵Food α -amylase I; ⁶Food α -amylase II with liquid β -amylase; ⁷Technical α -amylase; ⁸Glucobata-tine.

používa ju veľa výrobcov. Umožňuje stanoviť aktivitu pri optimálnom pH a vzhľadom na dosiahnuté výsledky pri jej zavedení a overovaní možno modifikovanú metódu SKB navrhnúť na prijatie na špecifikáciu preparátov α -amylázy v našich podmienkach.

Novším typom chromolytických testov na stanovenie aktivity α -amylázy je „S-test amyláza univerzál“, vyrobený v Chemických Závodoch Juraja Dimitrova. Substrát vo forme tablety obsahuje nerozpustný škrob s naviazaným

Obr. 2. Relácia hodnôt α -amylázy rôznych enzýmových preparátov, nameraných metódami SKB a S-testom amyláza univerzál. 1–7 ako v obrázku 1.

Fig. 2. Relation of α -amylase activity values for various enzyme preparations, measured by SKB method and by S-test amylase universal. For 1–7 see Fig. 1. ($^1(\alpha$ -Amylase activity (u); $^2\alpha$ -Amylase activity (SKB).)



farbivom, optimálne pH a teplota počas reakcie sa určí podľa konkrétneho enzýmového preparátu. Týmto postupom sa analyzovalo 9 vzoriek enzýmových preparátov. Orientačne sa overila aj použiteľnosť tej istej šarže S-testu amyláza univerzál po 6 mesiacoch skladovania pri laboratórnej teplote, pričom nameraná aktivita v štandardnom preparáte α -Amylase Rohalase A3 Serva bola po tomto čase bez zmeny. Porovnaním nameraných hodnôt aktivity S-testom amyláza univerzál s hodnotami získanými analýzou tých istých vzoriek metódou SKB (tab. 2) sa zistilo, že údaje o aktivite enzýmov, získané obidvoma metódami, sú navzájom úmerné (obr. 2) a prepočítací vzťah medzi SKB a relatívnymi u jednotkami S-testu je $1 u = 1,7 \times 10^{-3} \text{ SKB}$.

Za nevýhodu S-testu sa však pokladá vyjadrenie aktivity v neoficiálnych jednotkách ako relatívna aktivita. Vzhľadom na dosiahnutie reprodukovateľných výsledkov pri overovaní metódy na stanovenie aktivity enzýmových preparátov pre potravinársky priemysel možno očakávať, že S-test amyláza univerzál nájde praktické uplatnenie u výrobcov i používateľov priemyselných enzýmových preparátov. Najmä vtedy, ak súčasťou testu bude i štandardný enzýmový preparát s definovanou katalytickou aktivitou.

Do redakcie došlo 8. 3. 1989

Literatúra

1. BERGMAYER, H. U.: Methods of Enzymatic Analysis. Vol. 4. – Enzymes 2. Weinheim, Verlag Chemie 1984.
2. BERGMAYER, H. U.: Methods of Enzymatic Analysis. New York and London, Academic Press 1965.
3. TÄUFEL, A., Control and standardization analytics in application of amylolytic enzymes in food industry. Zborník Interbiotech '87, Enzyme Technologies, Bratislava 1987, s. 60.

4. RUTTLOFF, H. – HUBER, J. – ZICKLER, F. – MANGOLD, H. K., Industrielle Enzyme. Leipzig, VEB Fachbuchverlag 1978.
5. GODFREY, T. – REICHEL, J.: Industrial Enzymology. New York, The Nature Press 1983.
6. COLOWICK, S. P. – KAPLAN, N. O.: Methods in Enzymology I. New York, Academic Press Inc. Publishers 1955.
7. TÄUFEL, A. – GABOR, R. – EMMER, J. – ZEMEK, J., Lebensmittelindustrie, 33, 1986, s. 65.
8. DOBRÁNSKY, T. – POLÍVKA, L. – HAAS, I. – SOVA, O.: Purification of commercial technical grade α -amylase by industrial autofocusing. Zborník Interbiochtech '87, Enzyme Technologies, Bratislava 1987, s. 98.
9. SERVA, Fine Biochemicals for the Scientist. Heidelberg, Delivery Program 1987/1988.
10. SOMOGYI, M., J. Biol. Chem., 160, 1945, s. 61. In: Keil, B. – Šormová, Z., Laboratorní technika biochemie. Praha, Nakl. ČSAV 1959.
11. TAKASAKI, Y.: Pullulanase – Amylase Complex Enzyme from Bacillus subtilis. Agric. Biol. Chem., 51, 1987, s. 9.
12. PN 754 212/2-79 Potravinárska bolamyláza. Slovenské škrobárne, n. p., Trnava 1979.
13. Firemná literatúra: Jan Dekker, Holand: α -Amylase Determination of Liquefying Amylase (Modified Wohlgemuth Method) 1987.
14. Miles Kali-Chemie GmbH, Delivery Program 1986.
15. Gosudarstvennyye standarty ZSSR No. 20264, 4-74: Preparaty fermentnyye. Metody opredeleniya amylolytičeskoj aktivnosti.
16. SANDSTEDT, R. M. – KNEEN, E. – BLISH, M. J., Cereal Chem., 16, 1939, s. 712. In: Návod analytických metod v enzymologii. Praha, VÚPP 1978.
17. Enzympräparate. Standards für die Verwendung in Lebensmitteln. Hamburg, B. Behrs Verlag 1983.
18. Specifications for Identity and Purity. FAO Food and Nutrition Paper, No. 19, Rome 1981.
19. Guide to Specifications. FAO Food and Nutrition Paper, No. 5 Rev. 1, Rome 1983.
20. Firemná literatúra: Bio-La-Test α -amyláza. Lachema, Brno 1984.
21. Firemná literatúra: Spofa test α -amyláza. Hlohovec, Slovakofarma 1979.
22. SIGMA, Delivery Program 1987.
23. KUNIAK, L. – ZEMEK, J.: Chromolytic tablet tests for determination of the biopolymer hydrolase activities. Zborník Interbiotech '87, Enzyme Technologies, Bratislava 1987, s. 138.
24. Firemná literatúra: Postup stanovenia α -amylázových aktivít S-testom amyláza univerzál. Bratislava, CHZJD 1987.
25. BIELY, P. – MISLOVIČOVÁ, D. – MARKOVIČ, O. – KALÁČ, V.: Nový rozpustný chromogénny substrát pre α -amylázy. Bull. Čs. spol. biochem. při ČSAV a Slov. biochem. spoloč. pri SAV, 15, 1987, č. 2, s. 132.

Определение активности α -амилазы в ферментных препаратах

Резюме

Произшло обследование и выбор методов определения α -амилазы с особым вниманием на стандардизацию методов для анализа промышленных ферментных препаратов. Экспериментально проверились методы основаны на измерении окраски йодкрахмального комплекса после гидролиза крахмального субстрата α -амилазой без применения β -амилазы для обработки субстрата и с применением избытка β -амилазы для приготовления α -амилодекстрина. Дальше проверились методы с крас-

ночно обозначанными нерастворимыми субстратами. Результаты показали, что в рамках стандардизации аналитических методов для ферментных препаратов самым подходящим является SKB (Sandstedt-Kneen-Blish) метод.

Determination of α -amylase activity in enzyme preparations

Summary

A review and a selection of methods for determination of α -amylase activity were done. An emphasis was laid on standardization of methods for analysis of industrial enzyme preparations. Experimental verification was made with methods based on measuring of the colour of iodine-starch complex after the hydrolysis of starch substrate by α -amylase. There were used two types of methods: without using β -amylase for modification the substrate and with excess of β -amylase for α -amylodextrin preparation. Methods with colour-marked non-soluble substrates were also verified. The SKB method (Sandstedt-Kneen-Blish) was found the most suitable method from the point of view of standardization of analytical procedures for enzyme preparations.