

# AMILÁZ AKTIVITÁS MÉRÉSÉRE ALKALMAS KROMOGÉN SZUBSZTRÁT ELŐÁLLÍTÁSA

TEMESVÁRI JÁNOS ÉS HOSCHKE ÁGOSTON

Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest

Érkezett: 1989. szeptember 20.

Az amiláz aktivitás meghatározására többféle módszer használatos. Ezek között jelentősek a jódszín-változás, a turbidimetriás, a redukáló cukor növekedés mérésén alapuló módszerek. Mindegyik esetben az enzim szubsztrátja a keményítő.

Újabbban a keményítőtőhöz kapcsolt színezék az enzim által felszabaduló színintenzitás növekedésén alapuló módszerekkel kísérleteztek. RINDERKNECHT és munkatársai (1967) Remazol Brillant Blue színezékkel jelezték a keményítőt. Az enzim hatására megváltozott színintenzitást 595 nm hullámhosszon mérték oldatban. Ezen az elven alapszik az amilázteszt tablettá gyártására szabadalmazott eljárás (LUDOVIT és munkatársai, 1981). CESKA és munkatársai (1969) kék színű keményítő polimert Cibacron blau F3G—A (a továbbiakban: Cb F3G—A) színezékkel kapcsoltak.

Az orvosi gyakorlatban kiterjedten alkalmazzák a svéd gyártmányú Phadebas Amylase Test tablettákat vészérum, vizelet, nyál vizsgálati anyagok alfa-amiláz aktivitásának mérésére. A Phadebas tablettá Cb F3G-A színezékhez kovalensen kötött keményítőt és puffertartalmat tartalmaz. A gyári útmutatóban (ANON, 1982) közlik az abszorbancia és az amilázaktivitás matematikai összefüggését, amelynek alapján számítható a vizsgálati minta enzimaktivitása.

Az egyszerű felhasználási mód miatt nemcsak az egészségügy, hanem a biológiai iparok, az élelmiszeripar, a biotechnológia területén is igény van ilyen tesztre, a tablettá összetétel és a pH körülmények szükségesség változtatása után.

Az időszertűvé vált kérdés megoldása érdekében, foglalkoztunk az alfa-amiláz mérésére alkalmas kromogén szubsztrát hazai gyártástechnológiájával. Vizsgáltuk az alkotórészeiből előállítható amiláz-teszt tablettá tulajdonságait. Megvalósítottuk a keményítő térhálósítását, a színezék rögzítését a keményítőtőhöz. Laboratóriumi méretekben kidolgoztuk az amiláz-aktivitás mérésére alkalmas színes szubsztrátum előállításának egyszerű gyártástechnológiáját, a minimális reagensszükséglet felhasználása mellett.

## A keményítő térhálósítása

A keményítő térhálósítására epiklórhidrint alkalmaztunk eredményesen. A művelet lépései a következők voltak: 100 rész keményítőt 200 rész 0,1 mól/l nátriumhidroxid oldatban Vibrotherm készülékben rázattunk, 50 °C hőmérsékleten, 30 percig, ezután 1,44 rész epiklórhidrint adtunk hozzá, 60 percig rázattuk a fentiekhez hasonló módon (200 rpm). Majd 200 rész 0,1 mól/l nátriumhidroxid hozzáadása után 20 óráig 50 °C-on rázattuk.

Különböző eredetű keményítőtípusokat vizsgáltunk, ezek: burgonya, kukorica (Chinoin, Bp.), búza-keményítő (Reanal, Bp., Merck, Darmstadt). A keményítők térhálósítás utáni duzzadási értékei 4—4,5-szeres térfogatnövekedési érték között változtak. Az egyes keményítőtípusok között nem volt jelentős különbség, ezért a továbbiakban a Reanal gyártmányú búzakeményítőt használtuk.

A nátriumhidroxid oldattal előkezelt keményítő az epiklórhidrin hozzáadása után 1 óra elteltével sűrű, pépes konzisztenciájú lett. A rövid ideig tartó kezelés után nem adott jó eredményt, ezért csökkentettük a közeg koncentrációját és hosszabb ideig kevertük. Így a keményítő és a 0,1 mól/l nátriumhidroxid oldat 1:2 arányú hígításával, 20 órai keveréssel elértük azt, hogy az előállított termék az eredeti térfogat 4,5-szeresére nőtt, ami a térhálósítás eredményes befejezését tükrözte.

## A színezék rögzítése a keményítőhöz

A színezék rögzítése előtt azt vizsgáltuk, hogy a rendelkezésünkre álló Cibavron kék F3G-A (Pract., SERVA, Heidelberg) koncentrációja és a 620 nm-en mért abszorbancia (A) között lineáris-e az összefüggés. Az 54 mérési pont alapján számított egyenes egyenlete a következő volt:

$A = 0.0152 + 76,2 c$ ,  $r^2 = 0.998$  ( $c =$  A Cb F3G-A színezék koncentrációja, g/100 ml,  $r^2 =$  determinációs együttható).

A számítások szerint az összefüggés lineárisnak tekinthető.

A Cb F3G-A színezék azínklorid-csoportot tartalmaz.

A kémiai reakcióban bázikus közegben a klór leválik és az azin-csoport kovalens kötéssel kapcsolódik a keményítő molekulához (1. ábra).

A keményítőhöz való rögzítésének lépései a következők: A bázikus, térhálósított keményítőhöz 10%-os vizes oldatban CbFP3G-A színezéket adtunk (100 rész keményítőhöz 4 rész színezék oldatot), 3 órán át kevertettük 25 °C-on. Desztillált vízzel és 70%-os etanollal lúgmentesre mostuk (pH 6,0-ig), majd megszáritottuk, maximálisan 60 °-on. A keményítő mosását dekantálással, illetve centrifugálással végeztük.

Az amiláz aktivitás mérés lényegében a keményítő hidrolízise közben felszabaduló kék színezék mérésén alapszik. A percnkénti színintenzitás változás nagysága arányos az enzim-aktivitással. Az enzimreakció lejátszódásához optimális pH-t kell biztosítani az oldatban, ezt a Phadebas tablettá módszeréhez hasonlóan pH 7,0-ben állapítottunk meg. A száraz pufferelegy összetételét a következő foszfátos összetételben alkalmaztuk:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5,732 g

$\text{N}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2,456 g

A 8,188 g puffertartóhoz 0,24 g nátriumkloridot és 11,572 g a fentiekben leírt színezékkel rögzített keményítőt kevertünk. A komponenseket dörzsmozsárban megőröltük, a nagyobb mennyiségű adagot golyósmalomban homogenizáltuk (6–10 óra).

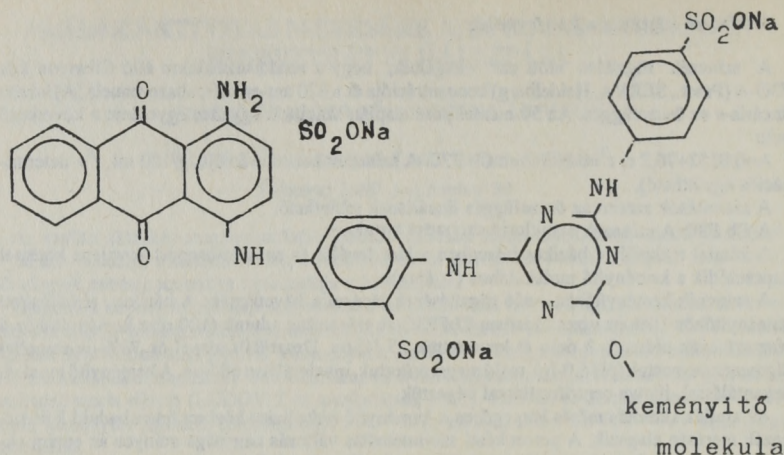
Az így előállított amiláz teszt pH 7,0-es értékét vizes oldatban ellenőriztük.

A tabletták szilárdsága érdekében az amiláz teszthez cellulózport adtunk, 1:1 tömegarányban. A cellulózzal kevert tabletták 0,5 MPa egységnél kisebb nyomáson, kézi erővel formálhatók voltak. A cellulóz az amiláz aktivitás mérését nem befolyásolta. Egy amiláz teszt tablettá tömege: 0,4 g, átmérője 13 mm, vastagsága 2 mm volt. A tabletták felülete fényes sima, nem törekény, vízben jól szuszpendálódtak.

## Az amiláz-aktivitás meghatározása

A szubsztrát elegyet úgy készítettük, hogy 1—1 db tablettát 5—5 ml desztillált vízben rázattunk 5 percig, 37 °C-on, az így előállított oldatban a következő koncentráció értékek voltak: a foszfát-só 0,1 mól/l, nátrium-klorid 0,008 mól/l, keményítő 23 mg/l. Az enzimoldat hozzáadása után 0 és 20 perc között inkubáltuk az oldatot (37 °C), majd 2%-os (m/v) nátriumhidroxiddal leállítottuk az enzimreakciót és szűrtük. Az abszorbancia változást ( $\Delta A$ ) vakpróbával szemben 620 nm hullámhosszon mértük. A vakpróba enzimoldatot nem tartalmazott. Az amiláz-aktivitást 1U egységben határoztuk meg,  $1 \text{ U} = 10^{-1} \Delta A \text{ min}^{-1}$ .

Az új amiláz teszt ellenőrzését a svéd Phadebas tablettával hasonlítottuk össze és standardként SERVA gyártmányú alfa-enzimet használtunk. Az új amiláz tesztel meghatározott amiláz-aktivitást a Phadebas módszerrel mért értékek függvényében a 2. ábrán mutatjuk be. A két módszer igen jó korrelációt adott ( $r = 0,978$ ),  $Y = -39,2 + 0,95 X$ , ahol  $Y =$  Phadebas módszerrel mért amiláz aktivitás,  $X =$  az új teszt módszerrel mért amiláz-aktivitás. Az egyenesek meredeksége,  $b = 0,95$  szignifikánsan nem tér el a  $b = 1,00$  értéktől, az egyenesek meredekségei (b) azonosnak vehetők. A regresszióanalízis számítása alapján közös egyenlet alkalmazható, amelynek az egyenlete  $Y' = -37,23 + 1,04 X'$  és nem tér el a hipotetikus  $b = 1,00$  meredekségű egyenestől.



1. ábra. A keményítőhöz rögzített Cibacron F3G—A képlete

#### Következtetések

Az eddigi vizsgálatok alapján a költséges, importból beszerezhető Phadebas Amylase Test tablettát hazai készítménnyel helyettesíthető.

Lehetőség van az amiláz teszt alkalmazásának további fejlesztésére. Könnyen változtatni lehet a színezett szubsztrát koncentrációján, vagy a pH értéken, a mérni kívánt amiláz tartalmú mintának megfelelően. Ezáltal az amiláz teszt nemcsak egyfajta vizsgálatra, hanem az élelmiszeripar, a biotechnológia területén és a rutinszerű analízisekben széles körben felhasználhatóvá válik.

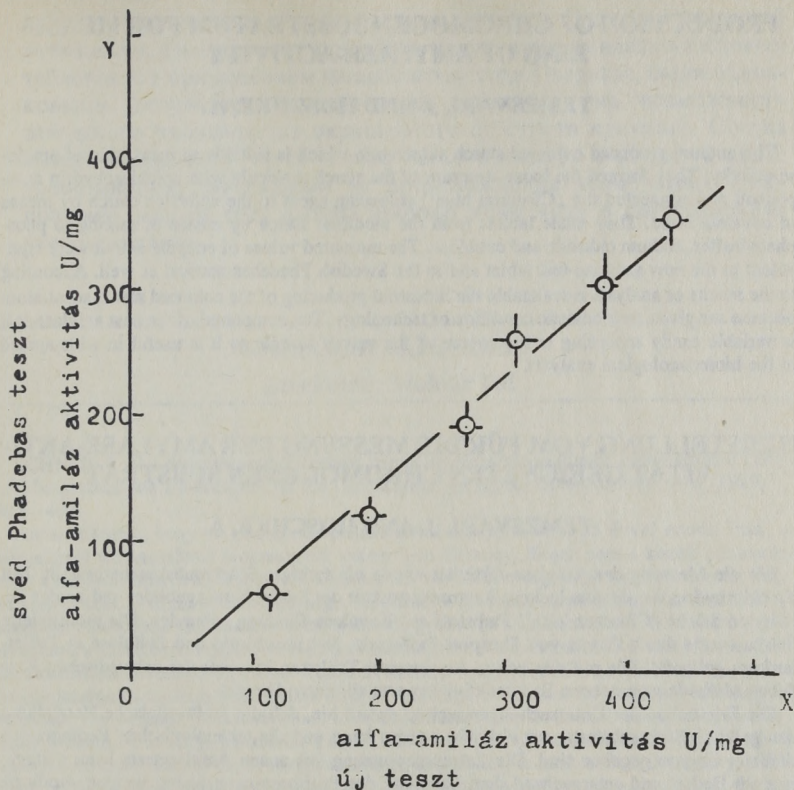
#### Irodalom

ANON (1982): Direction for use Phadebas Amylase Test Pharmacia Diagnostics Uppsala, Sweden.

CESKA, M., HULTMAN, E. and INGELMAN, B. (1969): A new method for the determination of alfa-amylase. *Experientia*, 25, 5, 555—556.

LUDOVIT, K. and JURAJ, Z. (1981): Spôsob prípravy chromogénneho skrobu pre sérióné kvantitatívne stanovenie alfa-amylázy v biologickom materiáli. Česloslovenská Patent, 192210, Bratislava.

RINDRKNÉCHT, H., WILDING, G. and HARERBACK, B., J. (1967): A new method for determination of alfa-amylase. *Experientia*, 23, 10, 805.



2. ábra. Az új és a svéd Phadebas módszerrel mért alfa-amiláz aktivitás összehasonlítása.  
 $Y = -39,2 + 0,95X$ ,  $r = 0,978$

## AMILÁZ AKTIVITÁS MÉRÉSÉRE ALKALMAS KROMOGÉN SZUBSZTRÁT ELŐÁLLÍTÁSA

TEMESVÁRI J. ÉS HOSCHKE Á.

Az amiláz-aktivitás mérésére alkalmas színes keményítő szubsztrátumot állítottak elő. Epiklorhidrin vegyülettel a keményítő molekula térhálósított, laza szerkezetét alakították ki és az aktivált keményítőhöz kovalens kötással „Cibacron kék” színezéket kapcsoltak. A módosított keményítőt foszfát-puffersó, nátrium-klorid és cellulóz hozzáadásával tablettázták. Az előállított új amilázteszt tablettával és a svéd Phadebas módszerrel mért enzimaktivitás értékek megegyeztek.

A vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a színezett keményítő szubsztrátum üzemi előállítására megvalósítható, a gyártástechnológia hazai feltételei adottak. Az új amilázteszt összetételén könnyen lehet változtatni az igényeknek megfelelően, ahogyan a vizsgálati minta eredete megköveteli, ezért a biotechnológiai analízisekben széles körben alkalmazható.

## PRODUCTION OF CHROMOGEN SUBSTRATUM FOR MEASURING OF AMYLASE-ACTIVITY

TEMESVÁRI, J. AND HOSCHKE, Á.

The authors produced coloured starch substratum which is suitable to measuring of amylase-activity. They formed the loose structure of the starch molecule with epichlorohydrin compound and connected the „Cibacron blue” colouring agent to the activated starch by means of covalent bond. They made tablets from the modified starch by means of mixing to phosphate-buffer, sodium chloride and cellulose. The measured values of enzyme activity were equivalent to the new amylase-test tablet and to the Swedish Phadebas method as well. According to the results of analysis is realizable the industrial producing of the coloured starch substratum because are given the domestic condition of technology. The compound of the new amylase-test is variable easily according to the source of the survey sample so it is useful in wide-spread in the biotechnological analysis.

## HERSTELLUNG VOM FÜR DIE MESSUNG DER AMYLASE-AKTIVITÄT GEEIGNETEN CHROMOGENEN SUBSTRAT

TEMESVÁRI, J. AND HOSCHKE, Á.

Für die Messung der Amylase-Aktivität wurde ein farbiges Stärkesubstrat hergestellt. Mit Epichlorhydrin wurde eine lockere Raumnetzstruktur der Stärke herausgebildet und zu der aktivierten Stärke „Cibacron blau” Farbstoff mit Kovalens-Bindung gebunden. Die modifizierte Stärke wurde durch Zusatz von Phosphat-Puffersalz, Natriumchlorid und Zellulose in Tablettenform gebracht. Die mit den neuen Amylasetest-Tabletten bzw. mit der schwedischen Phadebas-Methode gemessenen Enzymaktivitätswerte stimmten überein.

Die Ergebnisse der Untersuchungen weisen darauf hin, daß die großtechnische Herstellung des gefälten Stärkesubstrats verwirklicht werden kann und die technologischen Bedingungen dafür in Ungarn gegeben sind. Die Zusammensetzung des neuen Amylasetests kann einfach, je nach Bedarf und entsprechend dem Ursprung des Prüfmusters verändert werden, wodurch dieser Test in einem breiten Spektrum der biotechnologischen Analysen eingesetzt werden kann.

## ПРОИЗВОДСТВО ХРОМОГЕННОГО СУБСТРАТА, ПРИГОДНОГО ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ АМИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

*П. Темешвари и А. Хошке*

Для измерения амилазной активности был произведен подходящий для этого цветной субстрат крахмала. С помощью эпихлоргидрина крахмал принял рыхлую, пространственно-сеточную структуру, после чего к активированному крахмалу ковалентной связью присоединили краситель „Цибаурон синий”. Измененный таким образом крахмал — после добавления к нему пufferной соли, хлорида

натрия и целлюлозы — прессовали в таблетки. Значения энзимной активности, измеренные с помощью полученных амилазно-тестовых таблеток и с применением шведского метода Пхадевас, были одинаковыми. Результаты исследований указывают на возможность заводского производства окрашенного субстрата крахмала. Состав нового амилазного теста можно легко изменить в соответствии с требованиями, зависящими от происхождения испытываемых проб, поэтому данный тест можно широко применять в биотехнологическом анализе.

---

## KÜLFÖLDI LAPSZEMLE

Szerkeszti: Molnár Pál

---

SCHMID, R. D.: *Bioszenzorok fejlettségi szintje az élelmiszeranalitika szempontjából* (Entwicklungsstand von Biosensoren für die Lebensmittel-Analytik) *Lebensmitteltechnik* (1989) 9, 490—493.

Annak ellenére, hogy ez első enzim-elektrodákról már több mint 25 évvel ezelőtt írtak, a közvetlenül felhasználható bioszenzorok száma igen alacsony. Ennek nem a kisebb pontosság vagy a stabilitás hiánya az oka, hanem a konkuráló mérés technológiák pl. a nedves kémiai vagy az enzimatikus analízis. A biotechnológia fejlődése és a bioszenzorok könnyű automatizálhatósága következtében azonban ezen mérőérzékelők gyakorlati alkalmazásának növekedésére számíthatunk a következő években. Az Európai Közösség az élelmiszeranalitika területén is érezhető harmonizáló törekvésének eredményeként e módszerekre nagy jövő vár. A közlemény az enzimes folyóinjekciós-berendezés koncepciója alapján bemutatja az alkohol folyamatos gyors meghatározását. Az elemzési frekvencia ennél a mérőberendezésnél percenkénti, amely lineárisan tovább állítható. A másik példa szerint a hal és hús friss állapotára használják a bioszenzorokat, amelyek az elektrokémiai  $H_2O_2$  meghatározására alapulnak. Az enzimelektrodák könnyen miniaturizálhatók és mindenekelőtt idegen csírák, toxinok vagy növényvédőszer maradványok immunanalízisére alkalmasak. Sokat ígérők az immunszenzoros megoldások a viszkozitás változások meghatározására. Miniatűrben dolgoznak az aromák bioszenzoros meghatározásán, de itt még nem sikerült az élő szervezetek érzékelő sejteinek kielégítő érzékenységű utánzását elérni.

Molnár P.  
(Budapest)

REEFMAN, R.: *On-line ellenőrzési rendszer az élelmiszeripar számára* (On-line, Inspektionsysteme für die Lebensmittelindustrie) *Internationale Zeitschrift für Lebensmittel-Technologie und Verfahrenstechnik* 39 (1988) 7, 585—588

A technika mai állása mellett az üvegek (palackok) jelentős töltési sebességét figyelembe véve azok szubjektív ellenőrzése nem kielégítő. A korszerű, teljesen automatizált on-line ellenőrzési rendszer lehetővé teszi még a nagyteljesítményű szállítószalagon is az idegen anyag tartalom kívül az üvegek legcsekélyebb hibáinak kimutatását az üvegek fenékrészén, falán, vagy szájrészén is. Az eljárás rugalmasan alkalmazható fémdobozon és műanyag edényen is. Előnyösen használható élelmiszer, illetve élvezeti nyersanyagok ellenőrzésére, idegen anyagoktól történő elválasztására is.

Szarvas T.  
(Budapest)