

## Stanovenie aktivít hydroláz biopolymérov tabletovými chromolytickými testami

JÚRAJ ZEMEK — EUDOVÍT KUNIAK

**Súhrn.** V práci sa opisujú vlastnosti tabletových testov Spofa Test  $\alpha$ -amyláza (výrobok Slovakofarma, n. p., Hlohovec) a S-Testov Izoamyláza, Mikrobiálna amyláza, Glukoamyláza, Celková celulóza, Celulóza C<sub>x</sub>, Xylanáza, Beta-glukanáza, Dextranáza, Alfa-mananáza, Beta-mananáza, Celková proteáza a Elastáza (výrobky Chemických závodov Juraja Dimitrova, n. p., Bratislava — Pavilón diagnostík). Vyvinuli ich na chromolytickom princípe v Chemickom ústave CCHV Slovenskej akadémie vied v Bratislave. Tabletové S-Testy v kombinácii s kontrolnými materiálmi (S-Test Farebný štandard a S-Test Enzymové štandardy s deklarovanými hodnotami enzymových aktivít) umožňujú štandardizáciu stanovenia aktivít hydroláz biopolymérov v podmienkach rutínnej enzymovej analýzy v potravinárstve, zdravotníctve a poľnohospodárstve.

Hydrolázy biopolymérov patria medzi základné priemyselne využívané enzýmy, diagnostické znaky rôznych ochorení v humánnej i veterinárnej praxi, diagnostické znaky procesov patogenity fytopatogenity, resp. mikrobiálnej kontaminácie. Hydrolázy biopolymérov (amylázy, proteázy, celulózy, pektolytické enzýmy) predstavujú 95 % z priemyselne využívaných enzýmov. Rozšírenosť a význam hydroláz biopolymérov poukazujú na dôležitosť zaviesť štandardné metódy stanovenia ich aktivít. Základné, doteraz zaužívané metódy stanovenia aktivít hydroláz biopolymérov sa zakladajú na meraní prírastku reakčného produktu, napr. sacharogénne metódy [1] alebo rádiometrické metódy [2], úbytku substrátu alebo na základe zmien fyzikálnochemických vlastností polymérového substrátu (zmeny viskozity [3], nefelometrické metódy a pod.). Vzhľadom na neštandardnosť substrátu, zložitosť vykonania analýzy, rôznu citlivosť a špecifitu neumožňujú tieto metódy unifikáciu a nie sú preto vhodné na rutinnú analýzu.

Roku 1967 Rinderknecht [4] použil nový substrát — kovalentne viazané farbivo na sieťovaný škrob, a tak dal základ pre vývoj moderných chromo-

Ing. Juraj Zemek, CSc., Ing. Ludovít Kuniak, CSc., Chemický ústav CCHV SAV, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava.

lytických metód. Dnes sú na tomto princípe známe viaceré firemné súpravy na stanovenie amylolytickej aktivity — ako Amylochrome (Hoffmann — La Roche), DyAmyl (General Diagnostic — Gödecke), Phadebas (Pharmacia, Uppsala) a ďalšie, ktoré umožňujú pomerne jednoduché stanovenie  $\alpha$ -amylázyvej aktivity, použitý substrát však neumožňuje diferencovať medzi  $\alpha$ -amylolytickou a glukooamylázovou aktivitou. Rozšíreniu týchto súprav u nás bránili súčasne aj ekonomické dôvody: požiadavky na devízy a vysoká cena. Obdobné testovacie súpravy na stanovenie aktivít ďalších hydroláz biopolymérov neboli zatiaľ vyvinuté. Na stanovenie proteolytickej aktivity sa používa chromolytický kolagén (hide powder, Calbiochem).

### Teoretická časť

#### Príprava chromolytického substrátu a jeho vlastnosti

Pôvodné natívne substráty sa modifikujú v reakcii s bifunkčnými činidlami tak, aby získali dobré hydrodynamické vlastnosti (stupeň napúčania, pravidelný tvar častíc) pritom ale zostali vo vodnom prostredí nerozpustné. Takto upravené biopolyméry sa nechajú reagovať s reaktívnym farbivom za vzniku kovalentnej väzby. Pripravené substráty v práškovej forme sa adjustujú za prítomnosti mikrokryštalickej celulózy, tlmivého roztoku, resp. ďalších galenických zložiek do tabletovej formy.

Hydrolytickým účinkom enzýmu na takto modifikovaný biopolymér dochádza k uvoľneniu vo vode rozpustných oligosacharidov alebo peptidov s kovalentne viazaným farbivom. Aktivita hydroláz biopolymérov sa stanovuje spektrofotometricky, keďže absorbancia supernatantu získaného spracovaním analyzovanej vzorky je úmerná aktivite príslušnej hydrolázy biopolyméru.

Biopolyméry sieťované bifunkčnými činidlami (napr. 2-chlórmetyloxiránom a pod.) predstavujú v prostredí tlmivého roztoku za prítomnosti hydroláz, schopných hydrolyticky štiepiť ich natívne formy, heterogénne systémy, definované základnými fyzikálnochemickými parametrami, ako stupeň sieťovania, napúčací objem, stupeň substitúcie a pod. Tieto parametre, spolu s primárnou štruktúrou základného biopolyméru, ako aj druhom modifikovanej reakcie určujú rozsah interakcií enzýmových systémov so sieťovaným biopolymérom v reakcii prebiehajúcej na rozhraní fáz. Biopolymér modifikovaný v reakcii sieťovania si môže podľa stupňa sieťovania zachovať substrátové vlastnosti pre hydrolázy (ale napr. aj pre transglykozylačné enzýmy) svojej natívnej formy. Substrátové vlastnosti hydroláz jedného typu (napr.

pôsobiacej endomechanizmom) sa môžu špecificky zvýrazniť na úkor hydrolázy druhého typu (pôsobiacej exomechanizmom). Ďalším zvyšovaním stupňa sieťovania biopolymér stráca substrátové vlastnosti, ale pritom nadobúda charakter afinitného liganda všeobecného typu.

Stupeň sieťovania spolu s napúšťacím objemom sú parametre určujúce prístupnosť gélu sieťovaného biopolyméru pre enzým. Keď v dôsledku nízkeho napúšťacieho objemu alebo vysokého stupňa sieťovania je znemožnený prístup enzýmu do vnútornej štruktúry gélu, reakcia s enzýmom prebieha prevažne na povrchu partikul. Podiel sieťovaného biopolyméru, ktorý sa prejaví ako substrát v enzýmovej reakcii, je v tomto prípade malý. Takto modifikovaný substrát nie je vhodný na použitie v prostredí o nižšej aktivite enzýmu. Na druhej strane v prítomnosti vysokých aktivít hydroláz uvedená modifikácia umožňuje výhodné zníženie citlivosti tejto analytickej reakcie (napr. pri stanovení aktivity  $\alpha$ -amylázy v extraktoch pankreasu).

#### Kinetika interakcie hydroláz polysacharidov so sieťovanými chromolytickými substrátmi

Kým celkový povrch partikul gélu chromolytického substrátu suspendovaných v roztoku obsahujúcom enzým je  $A$  (v  $\text{cm}^2/\text{l}$ ),  $a$  reprezentuje časť povrchu obsadenú enzýmom. Rýchlosť sorpcie enzýmu  $v_a$  na sieťovaný substrát udáva vzťah

$$v_a = k_a (A - a) E$$

a rýchlosť desorpcie  $v_d$  udáva vzťah

$$v_d = k_d \cdot a$$

V rovnovážnom stave platí vzťah

$$\frac{a}{A} = \frac{K_L E}{1 + K_L E}, \quad \text{kde} \quad K_L = \frac{k_a}{k_d}$$

pričom  $K_L$  je konštanta analogická Michaelisovej konštante. V prípade sieťovaných substrátov s nábojom (sieťované kyslé polysacharidy, chitín alebo sieťované natívne polysacharidy modifikované v substituenej reakcii ionogénnymi skupinami) sa uplatňujú Coulombove sily a platí  $k_a \gg k_d$ . So zvyšovaním koncentrácie enzýmu dochádza k saturácii interakcie schopných centier sieťovaného substrátu, čo v prípade dobre prístupného gélu pre enzými predpokladá

$$a \longrightarrow A$$

Rýchlosť enzýmovej hydrolýzy  $v$  na rozhraní fáz možno opísať vzťahom  $v = k' E_a$ , kde  $E_a = a/A_E$  a  $A_E$  je plocha obsadená 1 mólem adsorbovaného

enzýmu. Celkové množstvo adsorbovaného enzýmu  $E_a$  je totožné alebo väčšie ako podiel enzýmu v komplexe enzým-substrát, pretože nie všetok sorbovaný enzým musí mať svoje aktívne miesta v blízkosti „terčových“ väzieb substrátu. Celkovú bilanciu enzýmu možno preto vyjadriť vzťahom

$$E_0 = E + E_a,$$

kde  $E_0$  je celkové množstvo enzýmu,  $E$  je enzým v roztoku a  $E_a$  je podiel enzýmu sorbovaný na sieťovaný substrát.

Potom pre rýchlosť enzýmom katalyzovanej reakcie  $v$  platí

$$v = \frac{k' A K_L E}{A_E(1 + K_L \cdot E)} = \frac{k' A E_0}{A_E E_0 + (A_E/K_L) + (A - a)},$$

resp.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k'} \left( \frac{A_E}{K_L A} + 1 \right) \frac{1}{E_0} + \frac{A_E E}{k' A E_0}.$$

V prípade vysokej aktivity  $E_0$  ( $E = E_0$ ), priesečník na osi ordinát na základe uvedeného vzťahu je daný hodnotou

$$\frac{A_E}{k' A}.$$

Pokiaľ  $A_E \gg A$ , možno uvedený vzťah zredukovať na tvar

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{k'} \frac{A_E}{K_L A} \frac{1}{E_0} + \frac{A_E}{k' A}.$$

Rýchlosť limitujúcim stupňom pri sorpcii enzýmu na vnútorný povrch parti-kúl sieťovaného substrátu je difúzia enzýmu do vnútornej štruktúry gélu. Za predpokladu difúzie bez interakcií medzi enzýmom a poréznym substrátom a za predpokladu, že hodnoty  $V_{\max}$  a  $K_M$  sa nemenia v priereze  $x$  porézneho substrátu (napr. následkom zmien pH alebo iónovej sily), možno písať

$$D_{\text{ef}} \frac{d^2(A - a)}{dx^2} - \frac{V_{\max}(A - a)}{K_M + (A - a)} = 0,$$

kde  $D_{\text{ef}}$  je koeficient efektívnej difúzie za podmienok

I.  $(A - a) =$  vonkajší povrch substrátu pri  $x = 0$ ,

II.  $\frac{d(A - a)}{dt} = 0$  pri  $x = L$

( $L$  je stredná hĺbka pórov)

## Zloženie tablet Spofa Test $\alpha$ -amyláza a S-Testov

Testovacia tableta Spofa Test  $\alpha$ -amyláza je zložená z chromolytického škrobového substrátu (60 mg), mikrokryštalickej celulózy, pufovacích zložiek (pH 7,0) a zložiek zabezpečujúcich proteínové pozadie experimentu.

S-Testy hydroláz biopolymérov sú nepufované, pretože sú určené na stanovenie aktivít hydroláz biopolymérov rovnakého typu, ale rôzneho pôvodu, ktoré sa líšia práve rôznym optimom pH. Tableta S-Testov obsahuje 50 mg chromolytického substrátu (chromolytický sieťovaný škrob, dextran, pululan, celulózu mikrokryštalickú, hydroxyetylcelulózu, xylan, lichenan, alfa-manan, beta-manan, albumín hovädzieho séra, ovalbumín, kazeín, kolagén, elastín a pod.) a mikrokryštalickú celulózu.

### Postup stanovenia:

Postup stanovenia aktivít hydroláz biopolymérov, je štandardný pre všetky hydrolázy vyrábané v CHZJD, n. p., Bratislava a Slovakofarma, Hlohovec. Jednotná metodika za použitia tablety príslušného S-Testu (resp. Spofa Testu) umožňuje stanovenie ktorejkoľvek aktivity hydrolázy biopolyméru [5].

1. Do centrifugačnej skúmavky o priemer 10 až 12 mm sa napipetuje 1 ml príslušného tlmivého roztoku.

2. Mikropipetou sa pridá 100  $\mu$ l vzorky a roztok sa inkubuje 5 minút pri teplote 37 °C.

3. Pinzetou sa pridá testovacia tableta S-Testu resp. Spofa Testu a nechá sa inkubovať 15 minút pri teplote 37 °C bez miešania.

4. Po 15 minútach sa pridajú 4 ml zastavovacieho roztoku (10 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + + 900 ml destilovanej vody + 100 ml acetónu), pričom sa reakčný roztok dobre premieša.

5. Reakčná zmes sa centrifuguje 5 minút pri 1500–1700 g, nie skôr ako 5 minút po pridaní zastavovacieho roztoku. Pracovisko, kde nemožno centrifugovať, môže reakčnú zmes filtrovať, najvýhodnejšie cez filtračný papier Whatman 1 alebo Schleicher Schuell 595, prípadne iný vhodný filtračný papier. Pri filtrácii sa však časť farbiva sorbuje na papier, preto sú po centrifugovaní hodnoty absorbancie filtrátu o niečo nižšie ako supernatantu. V závislosti od typu filtračného papiera sa tieto hodnoty líšia o 7–30 %. Pri filtrácii sa preto musí robiť korekcia na sorbované farbivo.

6. Zmeria sa absorbancia supernatantu po centrifugovaní alebo filtrátu po filtrovaní pri 620 nm oproti vode v kyvete hrúbky 1 cm.

7. Z nameranej hodnoty absorbancie sa vypočíta aktivita enzýmu podľa tohto postupu:

Keďže 100 mg testovacia tableta obsahuje 50 mg chromogénneho substrátu, stanoví sa absorbanca jednej tablety za podmienok, keď sa celý prítomný substrát úplne zhydrolyzuje prídavkom prebytku enzýmu. Takto stanovená absorbanca ( $A_{\text{Tabl.}}$ ) sa pre každú výrobnú šaržu udáva v návode a pohybuje sa v rámci hodnôt 8–12 v závislosti od množstva naviazaného farbiva. Jedna jednotka napr. proteolytickej aktivity zodpovedá 1 mg chromolytického proteínového substrátu hydrolyzovaného za 1 hodinu. Pokiaľ  $S \gg E$ , potom platí, že

$$\text{Aktivita} = \frac{A}{A_{\text{Tabl.}}} \cdot 2 \cdot 10^6,$$

kde  $A_{\text{Tabl.}}$  je absorbanca nameraná po úplnej hydrolyze testovacej tablety,  $A$  absorbanca nameraná pri meraní aktivity v biologickej tekutine.

### Úprava pre stanovenie nízkych aktivít

Nízke aktivity možno stanoviť pomocou S-Testov predĺžením inkubačného času z pôvodných 15 minút až na 150 minút. Pochopiteľne, takto nameraná výsledná aktivita sa musí deliť faktorom predĺženia reakčného času.

Pri práci s jedným typom hydrolázy biopolyméru (napr. slinný a pankreatický izoenzým  $\alpha$ -amylázy v Spofa Teste) možno vychádzať pri stanovení aktivít z kalibračného grafu osobitne zhotoveného pre daný typ enzýmu, ktorý zodpovedá funkčnej závislosti

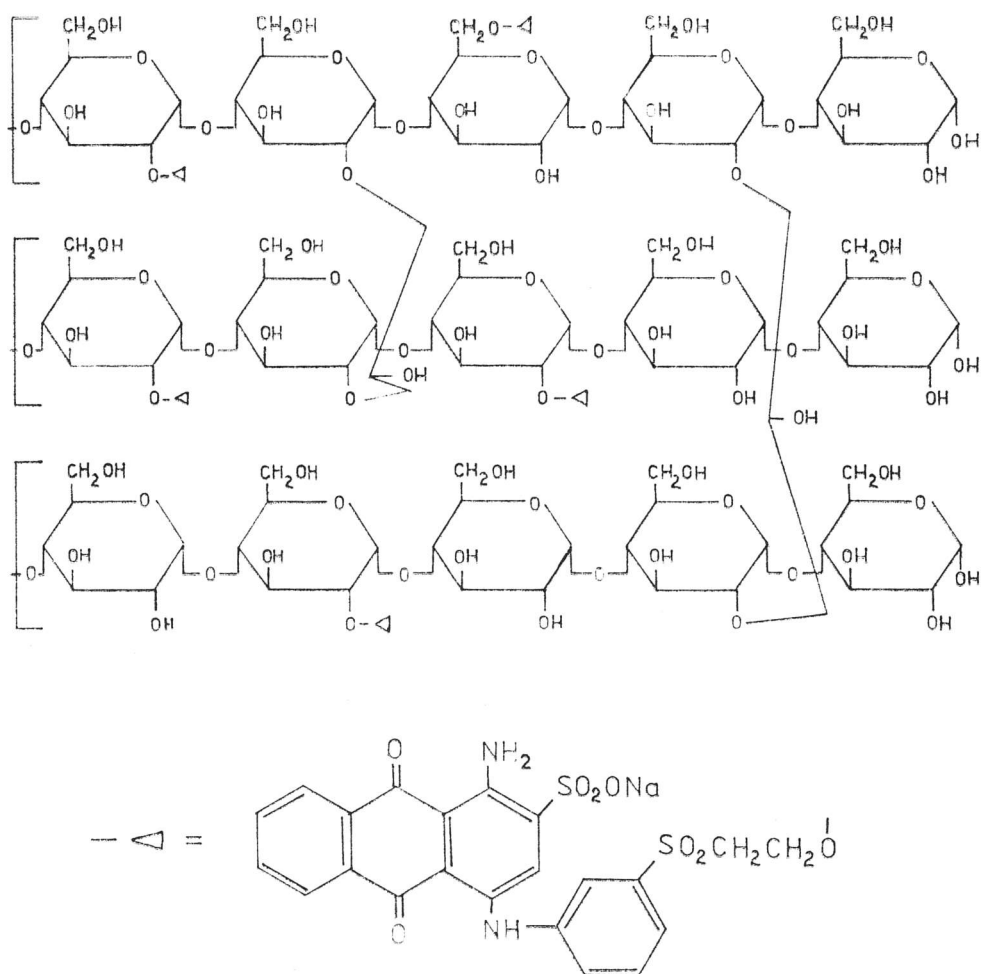
$$a = 10^{\frac{\log A + K_1}{K_2}},$$

kde  $a$  je aktivita enzýmu,  $A$  absorbanca, konštanty  $K_1$  a  $K_2$  závisia od modifikácie polymérneho substrátu [6].

## Diskusia

### a) Glykanázy

Hlavnou zložkou testov na stanovenie aktivít glykanáz je polysacharidový chromolytický sieťovaný substrát. Z polysacharidov sa takto podarilo pripraviť substrát na stanovenie  $\alpha$ -amylázovej (obr. 1), glukooamylázovej, pululanázovej, dextranázovej, celulázovej celkovej a endo-( $C_x$ )-celulázovej aktivity, xylanázy  $\beta$ -glukanázy (lichenáza) a  $\alpha, \beta$ -mananázy [7–9]. Základné natívne substráty nie sú vhodné na jednoduché testy na stanovenie aktivít hydroláz biopoly-



Obr. 1. Schéma štruktúry sieťovaného chromolytického škrobu. Trojuholníkmi je znázornené kovalentne viazané farbivo Remazol Brilliant Blue.

Fig. 1. Structure diagram of crosslinked chromolytic starch. Triangles represent the covalently bound dye Remazol Brilliant Blue.

mérov, keďže nemajú vo svojom priereze homogénne vlastnosti a vo vodnom roztoku majú malý napúčací objem (okolo 1,6 ml/g), v dôsledku čoho by enzýmová hydrolýza prebiehala veľmi pomaly. Preto je potrebné natívny substrát modifikovať tak, aby sa viacnásobne zvýšila hodnota jeho napúčacieho objemu, a tým zabezpečila vyššiu rýchlosť enzýmovej hydrolýzy. Poznatky získané z teoretických štúdií sieťovacích reakcií, predovšetkým polysacharidov s 2-chlórmetyloxiránom [13–17], na základe ktorých sa pripravili rôzne

varianty sieťovaných biopolymérov o rôznom stupni sieťovania, rôznom napúšťacom objeme a stupni substitúcie chromofórovou skupinou, sú veľmi užitočné. Na základe optimalizácie uvedených parametrov sa podarilo pripraviť chromolytický škrob so substrátovými vlastnosťami pre  $\alpha$ -amylázu, ktorý na rozdiel od testov Phadebas [18, 19], DyAmyl a Amylochrome má silne potlačené substrátové vlastnosti pre amylolytické exoenzy [20]. Schéma sieťovaného škrobu použitého ako substrát v S-Testoch a Spofa Teste  $\alpha$ -analýza je znázornená na obrázku 1. Substitučné reakcie na  $\alpha$ -1, 4(6), ale aj  $\beta$ -1,4, resp  $\beta$ -1,3(4) glukanoch počas sieťovania prebieha predovšetkým na hydroxylových skupinách v polohách C-2 a C-6 [21, 22], nie esenciálnych z hľadiska priebehu enzymovej reakcie [23, 24].

#### b) Proteázy

Hlavnou zložkou testov na stanovenie aktivít proteáz je sieťovaný chromolytický proteín [10, 11] alebo elastín [12]. V prípade proteolytických enzýmov, napr. trypsín (EC 3.4.4.4), chymotrypsín (EC 3.4.4.5) a pepsín (EC 4.4.1.1), ide o proteolytické endohydrolázy, ktoré sa líšia svojou špecifitou k peptidovým väzbám proteínového substrátu, fyzikálnymi vlastnosťami i fyzikálnochemickými reakčnými parametrami. Špecifita trypsinu je orientovaná predovšetkým na peptidové väzby, na ktorých sa zúčastňujú argínin a lyzín svojimi karboxylovými skupinami. Chymotrypsín sa orientuje prevažne na aromatickú stranu refazea peptidov, a to najmä vo väzbe s leucínom. Obidve tieto proteázy sú alkalické, serínového typu a prejavujú okrem proteolytického účinku aj esterolytický efekt. Vzhľadom na substrátové vlastnosti sa od obidvoch predchádzajúcich proteáz odlišuje kyslá endohydroláza pepsín vylučovaná do žalúdočného obsahu so špecifitou k peptidovým väzbám v susedstve hydrofóbných skupín, napr. Phe-Leu, Phe-Phe, Phe-Tyr, a pod., a ďalej tie peptidové väzby, ktoré sú v susedstve hydrofóbných zvyškov dikarbónových aminokyselín ako Glu-Tyr, Leu-Glu, Ala-GluNH<sub>2</sub>. Pepsín je ireverzibilne deaktivovaný pri pH 7. Je zrejmé, že pri proteolytických enzýmoch neexistuje jediný prirodzený substrát, proti ktorému by sa deklarovali jednotky aktivity a základné kinetické vzťahy. Substrátové vlastnosti proteínov, resp. glykoproteínov sú určené zastúpením terčových aminokyselín v použítom proteíne. Preto sa používajú viaceré jednotky na vyjadrenie proteolytickej aktivity, medzi ktorými neexistuje jednoduchý prepočítavací vzťah. Aminokyselinové zloženie niektorých proteínov, využívaných na prípravu chromolytických substrátov proteáz, uvádzame v tabuľke 1. Na stanovenie elastázovej aktivity sa používa ako substrát elastín z ligamentum nuchae a aorty býka.

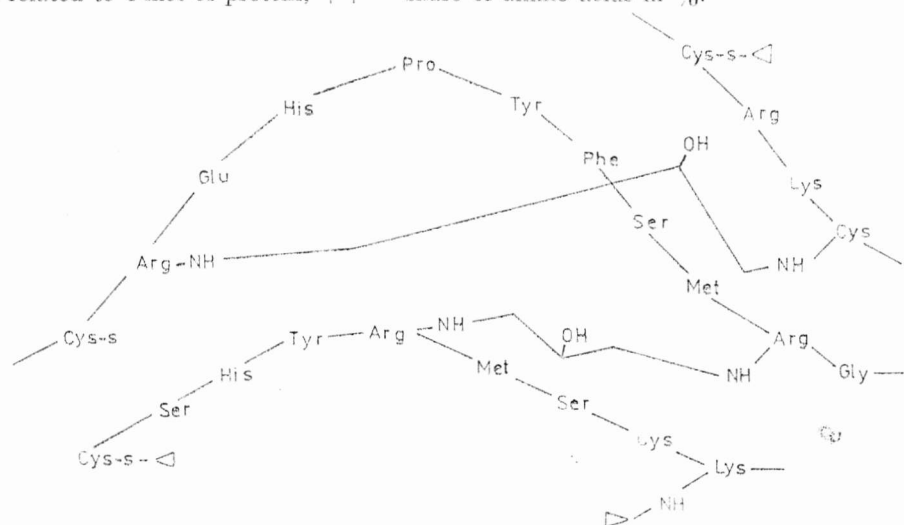


Tabuľka 1. Aminokyselinové zloženie chromolytických proteínov  
Table 1. Amino acid composition of chromolytic proteins

Albumín hovädzieho séra <sup>(1)</sup>		Ovalbumín <sup>(2)</sup>	Kazeín <sup>(3)</sup>	Kolagén <sup>++(4)</sup>
Lys	62	20	7.9	2.7
Arg	22—23	15	4.6	5.0
His	17	7	2.2	0.5
Asp	54	32	11.0	4.5
Thr	34	16	11.1	1.8
Ser	26	36	11.6	3.6
HPro	—	—	—	9.4
HLys	—	—	—	0.74
Glu	77—78	52	23.6	7.2
Pro	30	14	15.2	13.8
Gly	16	19	3.5	32.0
Ala	46	35	12.1	11.2
Cys	36	7	1.2	0.1
Val	37—37	28	8.7	2.0
Met	4	16	1.7	0.43
Ile	14	25	9.4	1.1
Leu	62	32	9.3	2.5
Tyr	20	13	8.2	0.26
Phe	27	19	4.9	1.3
Trp	2	3	1.0	—

+ — počet aminokyselín vzťahovaný na 1 mol proteínu; ++ — percentuálne zastúpenie aminokyselín.

(1)Albumin of bovine serum; (2)Ovalbumin; (3)Casein; (4)Collagen; + — Amount of amino acids related to 1 mol of protein; ++ — share of amino acids in %.



Obr. 2. Schéma štruktúry sieťovaného chromolytického proteínu. Kovalentne viazané farbivo znázornené ako na obrázku 1.

Fig. 2. Structure diagram of crosslinked chromolytic protein. For the covalently bound dye see Fig. 1.

Schému chromolytického sieťovaného proteínu, zodpovedajúcu substrátu v S-Teste proteáza univerzál, resp. S-Teste elastáza, znázorňuje obrázok 2.

Z uvedených údajov je zrejmé, že chromolytické S-Testy hydroláz biopolymérov predstavujú ucelený systém na stanovenie hydroláz biopolymérov pri ich príprave a izolácii, resp. pri ich priemyselných aplikáciách. Štandardnosť vykonania analýzy zabezpečuje nielen použitie štandardných substrátov a unifikovanej metodiky, ale aj použitie kontrolných materiálov ako S-Test Farebný štandard ku kontrole spektrofotometrov [25, 26] a kontrole pracovného postupu i tabletové enzýmové štandardy s deklarovanými hodnotami aktivít hydroláz biopolymérov ku kontrole správnosti vykonania analýzy a funkčnosti testu [5]. Za pomoci uvedených kontrolných materiálov variačný koeficient stanovenia aktivít hydroláz biopolymérov nepresiahol v sérii zo dňa na deň i pri súboroch meraní z viacerých laboratórií hodnotu 4 % [20, 26].

## Literatúra

1. SOMOGYI, M.: *J. Biol. Chem.*, **12**, 1952, s. 195.
2. ZEMEK, J. — KUČÁR, Š. — KUNIAK, L. — KOLINA, J.: *AO* 204 179.
3. BLOM, J. — BAK, A.: *Z. phys. Chem.*, **256**, 1938, s. 197.
4. RINDERKNECHT, H.: *Experientia*, **23**, 1976, s. 805.
5. Diagnostika CHZJD. Bratislava 1983.
6. GERGEL, J. — JANIŠ, J. — KUNIAK, L. — ZEMEK, J.: *Biochem. clin. bohemoslov.*, **9**, 1980, s. 195.
7. KUNIAK, L. — ZEMEK, J.: *AO* 192 202.
8. KUNIAK, L. — ZEMEK, J.: *AO* 192 210.
9. KUNIAK, L. — ZEMEK, L.: *AO* 202 761.
10. ZEMEK, J. — KUNIAK, L.: *AO* 194 592.
11. ZEMEK, J. — KUNIAK, L. — JANIŠ, J. — JURČOVÁ, Z.: *Biochem. clin. bohemoslov.*, **12**, 1983, s. 61.
12. LUKÁŠOVÁ, J., ZEMEK, J. — AUGUSTÍN, J. — KUNIAK, L.: *Arch. Lebensm.-Hyg.*, **33**, 1982, s. 128.
13. KUNIAK, L. — MARCHESSAULT, R. H.: *Starch*, **24**, 1972, s. 110.
14. HOLLINGER, G. — KUNIAK, L.: *Biopolymers*, **13**, 1974, s. 879.
15. KUNIAK, L.: *AO* 160 814.
16. ZEMEK, J. — BAUER, Š. — KUNIAK, L.: *Biopolymers*, **18**, 1979, s. 2135.
17. ZEMEK, J. — KUNIAK, L. — BAUER, Š.: *AO* 151 258.
18. NUNOKAWA, Y. — MENA, M. — MARCO, A.: *Nippon Jozo Kyokai Zasshi*, **68**, 1973, s. 52.
19. PÁRKÁNY-GYÁRFÁS, A. — VÁMOS-VIGYÁZÓ, L.: *Starch*, **31**, 1979, s. 328.
20. JANIŠ, J. — ŠALLAIOVÁ, Z. — ZEMEK, J. — KUNIAK, L.: *Biochem. clin. bohemoslov.*, **10**, 1981, s. 285.

21. LUBY, P. — KUNIAK, L.: *Makromol. Chem.*, 180, 1979, s. 2207.
22. LUBY, P. — KUNIAK, L.: *Makromol. Chem.*, 180, 1979, s. 2213.
23. ZEMEK, J. — KUČÁR, Š. — BAUER, Š.: *Eur. J. Biochem.*, 40, 1973, s. 195.
24. ZEMEK, J. — KUČÁR, Š. — ZÁMOCKÝ, J.: *Eur. J. Biochem.*, 89, 1978, s. 291.
25. KUNIAK, L. — ZEMEK, J. — JANIŠ, J.: *PV* 4822, 1981.
26. JANIŠ, J. — ZEMEK, J. — JURČOVÁ, Z. — KUNIAK, L.: *Biochem. clin. bohemoslov.*, 11, 1982, s. 357.

## Определение активности гидролаз биополимеров при помощи таблеточных хромолитических тестов

### Резюме

В работе описаны свойства таблеточных тестов «Спофа Тест  $\alpha$ -амилаза» (производство «Словакофарма», н. п., Глоговец) и С-Тестов Изоамилаза, Микробная амилаза, Глюкоамилаза, Общая целлюлаза, Целлюлаза  $C_x$ , Ксиланаза, Бета-глюканаза, Декстраназа, Альфа-маннаназа, Бета-маннаназа, Общая протеаза, Эластаза (изделия Химического комбината им. Г. Димитрова, н. п., Братислава — Павильон диагностических препаратов). Они были разработаны на хромолитическом принципе в Химическом институте Центра химических наук Словацкой академии наук в Братиславе. Таблеточные С-Тесты в комбинации с контрольными материалами (С-Тест «Цветной стандарт» и С-Тест «Ферментные стандарты» с объявленными значениями ферментных активностей) позволяют осуществить стандартизацию определения активностей гидролаз биополимеров в условиях практического ферментного анализа в пищевой промышленности, в здравоохранении и в сельском хозяйстве.

## Determination of activities of biopolymer hydrolases by tablet chromolytic tests

### Summary

The properties of tablet tests, such as Spofa  $\alpha$ -amylase (the product of Slovakofarma, Hlohovec) and S-Tests Isoamylase, Microbial amylase, Glucoamylase, Total cellulase,  $C_x$  cellulase, Xylanase, Beta-glucanase, Dextranase, Alpha-mannanase, Beta-mannanase, Total protease and Elastase (the products of the Chemical Works of Juraj Dimitrov, Bratislava — Pavilon on Diagnostics) are described. They were developed on a chromolytic principle at the Institute of Chemistry, Centre for Chemical Research of the Slovak Academy of Sciences in Bratislava. Tablet S-Tests in combination with control materials (S-Tests Dye Standard and S-Test Enzyme Standards with declared values of enzymatic activities) enable a standardized determination of activities of biopolymer hydrolases under conditions of practical enzyme analysis in food industry, health service and agriculture.