

## Note

### Verwendung der vernetzten Amylose zur selektiven Bestimmung der $\alpha$ -Amylase mittels Radialdiffusion

MIRCEA A. MATULESCU, HORST D. SCHILL UND TRAIAN BENJIA

*Institut für Biologische Wissenschaften zu Bukarest, Abteilung für Molekularbiologie 77748 Bukarest 17, Splaiul Independenței Nr. 296 (S. R. Rumänien)*

(Eingegangen am 23. Juli 1982, angenommen in revidierter Form am 19. November 1982)

In letzter Zeit wird den auf radialer Diffusion in Gelen fussenden biochemischen Analysenverfahren eine stetig wachsende Beachtung geschenkt, da sie vor allem als Screening-Verfahren in der Mikrobiologie, dann in der immunochemischen Analyse<sup>1,2</sup>, in der Enzymologie zur Aufdeckung katalytischer Aktivitäten<sup>3–5</sup> sowie zur halbquantitativen Bestimmung von Enzymaktivitäten<sup>6–9</sup> von Vorteil sind.

Die Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase (EC 3.2.1.1) mittels Radialdiffusion bildete den Gegenstand schon zahlreicher Untersuchungen<sup>6,7,9–10</sup>. Die verhältnismässig hohe Zahl der auf diesem Gebiet veröffentlichten Arbeiten ist voll berechtigt, zieht man das besondere Interesse in Betracht, welches diesem Enzym mit seinen Verflechtungen mit der pharmazeutischen und Lebensmittelindustrie, mit der präparativen und analytischen Chemie und Biochemie sowie mit der klinischen Chemie und Diagnostik<sup>11</sup> geschenkt wird. Die erwähnten Arbeiten sehen die Verwendung von löslicher Stärke als Substrat, in Agar oder einem anderen gelbildenden Medium—wie z.B. Agarose—verteilt, vor. Die Anwendung der radialen Diffusion erlaubt die Bestimmung der amylolytischen Enzyme in ihrer Gesamtheit ( $\alpha$ -Amylase,  $\beta$ -Amylase, Glucoamylase), die stark miteinander interferieren<sup>12</sup>, indem sie alle auf die gleichen Substrate einwirken und oft nebeneinander in den verschiedenen biologischen Materialien vorkommen<sup>13</sup>.

In der vorliegenden Arbeit berichten wir über die Anwendung von Amylose und vernetzter Amylose als Substrat zur selektiven Bestimmung der  $\alpha$ -Amylase mittels Radialdiffusion. In früheren Arbeiten<sup>14–18</sup> zeigten wir, dass die mit 1-Chloro-2,3-epoxypropan (Epichlorhydrin) vernetzte Amylose ein spezifisches Substrat für die  $\alpha$ -Amylase (Endoamylase) darstellt, ohne aber auch ein Substrat für die  $\beta$ -Amylase und Glucoamylase (Exoamylasen) zu sein. Diese Eigenschaft erlaubte es uns, die  $\alpha$ -Amylase in Anwesenheit von  $\beta$ -Amylase<sup>14–16</sup> oder von Glucoamylase<sup>15</sup> zu bestimmen oder sie affinitätschromatographisch an vernetzter Amylose von den begleitenden Exoamylasen zu trennen<sup>14–18</sup> ähnlich, wie es Weber *et al.*<sup>19</sup> an vernetzter Stärke verwirklichten.

## EXPERIMENTELLER TEIL

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Präparate verwendet:  $\alpha$ -Amylase (Karl Roth),  $\beta$ -Amylase (Sigma), Amylose (Koch-Light) und mit 1-Chloro-2,3-epoxypropan vernetzten Amylose<sup>20,21</sup>. Die Vernetzung der Amylose mit 1-Chloro-2,3-epoxypropan wurde in basischem Milieu, wie früher beschrieben<sup>20,21</sup>, vorgenommen, wobei unterschiedliche Amylose-1-Chloro-2,3-epoxypropan Verhältnisse beachtet und folgende Präparate erzielt wurden: Amylose X-10\*, Amylose X-50, Amylose X-90, Amylose X-100 und Amylose X-110. Die Amylose X-100, die den für unsere Zwecke günstigsten Vernetzungsgrad aufweist, wird wie folgt erhalten: Amylose (10 g) in Pulverform wurde in auf 0–5° abgekühlte 5M Natriumhydroxidlösung (30 mL) eingetragen und unter Rühren portionsweise mit 1-Chloro-2,3-epoxypropan (10 g) versetzt. Sodann wird das Reaktionsgemisch 1 h auf dem Wasserbad zunächst bei 40–50° und dann abschliessend noch 2 h bei 60–75° erhitzt. Das erhaltene brüchige Gel wird nun im Reaktionsgefäß zerkleinert und mit Wasser ausgiebig bis zur vollständigen Entfernung des Natriumhydroxids gewaschen und auf Sieben mit entsprechender Maschenweite granuliert. Die erhaltenen Präparate wurden nach Entwässerung mit Aceton an der Luft getrocknet<sup>22</sup>.

Die zur Diffusion notwendigen Gele wurden durch homogene Verteilung von Amylose bzw. vernetzter Amylose (1 g) in auf 60–70° erwärmter 1%-iger Agarlösung (100 mL) mit einem pH-Wert von 6,5–6,8 erhalten. Die erhaltene Suspension wurde dann auf Platten (8 × 8 cm) gegossen, so daß eine Gelschicht mit gleichmässiger Dicke von 0,3 mm entstand (20 mL Suspension für Platten von 8 × 8 cm). Der Durchmesser der Ausbohrungen betrug 3,5 mm. In diese wurden je 30  $\mu$ L  $\alpha$ -Amylaselösungen mit Konzentrationen von 0,003–1 mg/mL, bzw.  $\beta$ -Amylaselösungen mit Konzentrationen von 0,001–0,30 mg/mL eingetragen. Die gewöhnlich angewandte Diffusionszeit betrug 20 h bei 25° in feuchter Kammer, jedoch wurden in einigen Versuchen die Proben auch erst nach 62 h entwickelt. Zur Entwicklung wurde 0,1 Iodlösung verwendet.

Die spezifischen reduktometrisch mit 3,5-Dinitrosalizylsäure-Reagens<sup>23</sup> bestimmten Enzymaktivitäten der verwendeten Enzyme betrugen 20,4  $\mu$ mol freigesetzte Maltose  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg<sup>-1</sup> Protein im Falle der  $\alpha$ -Amylase und 52,3  $\mu$ mol freigesetzte Maltose  $\cdot$  min<sup>-1</sup>  $\cdot$  mg<sup>-1</sup> Protein im Falle der  $\beta$ -Amylase.

## ERGEBNISSE UND DISKUSSION

In Abb. 1 und 2 sind die mit 0,1M Iodlösung entwickelten Gelplatten nach 20-h Diffusion der Enzyme wiedergegeben. Man bemerkt, daß sich die  $\alpha$ -Amylase sowohl in dem Gel mit Amylose, als auch in dem mit vernetzter Amylose in ähnlicher

\*Der Buchstabe X weist darauf hin, daß die Amylose vernetzt ist, während die darauffolgende Zahl die Menge des zur Vernetzung von 100 g Amylose verwendeten 1-Chloro-2,3-epoxypropan in Gramm ausdrückt.

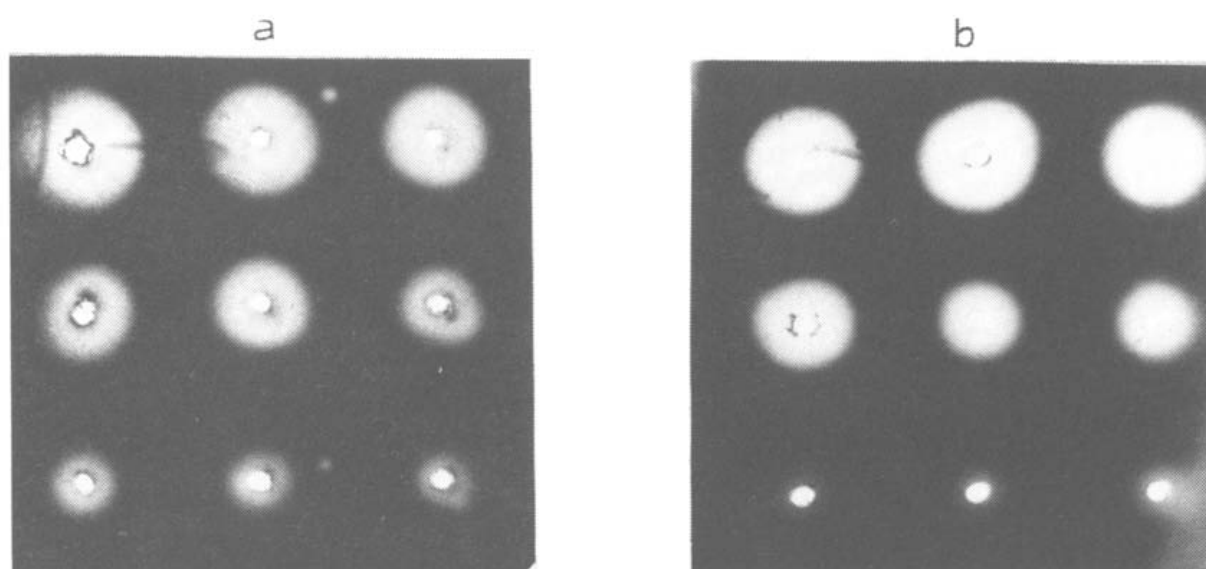


Abb. 1 Diffusion der  $\alpha$ -Amylase auf mit Amylose (a), bzw. vernetzter Amylose (b) beschickten Gelplatten. Aufgetragene Enzymmenge: 30  $\mu$ L von Enzymlösungen, deren Konzentrationen bei 1–0,003 mg/mL lagen.

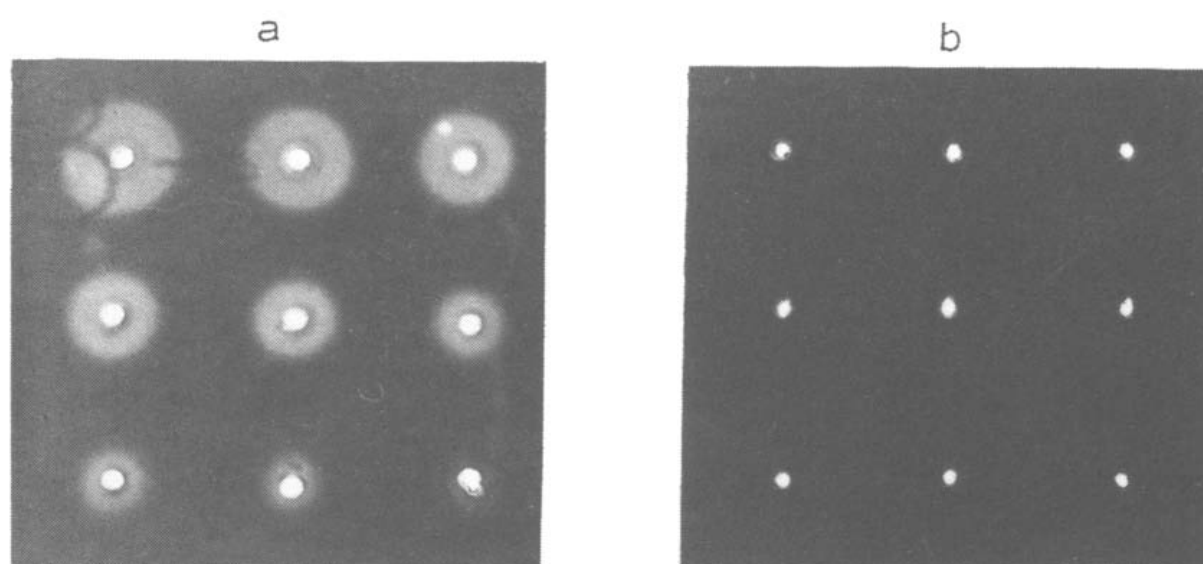


Abb. 2 Diffusion der  $\beta$ -Amylase auf mit Amylose (a), bzw. vernetzter Amylose (b) beschickten Gelplatten. Aufgetragene Enzymmenge: 30  $\mu$ L von Enzymlösungen, deren Konzentrationen bei 0,3–0,001 mg/mL lagen.

Weise verhält, während die  $\beta$ -Amylase ausschliesslich in Gel mit Amylose, ihrem natürlichen Substrat, ihre Aktivität zur Geltung bringen kann. Auch bei relativ hohen  $\alpha$ -Amylasekonzentrationen wird im Gel mit vernetzter Amylose keine amylytische Aktivität beobachtet.

Stellt man die Durchmesser der Diffusionszonen, die sich bei den mit Amylose, bzw. mit vernetzter Amylose beschickten Gelplatten gebildet haben in Abhängigkeit von dem logarithmischen Wert der angewandten  $\alpha$ -Amylasekonzentrationen graphisch dar, so kann eine Linearität für das gesamte Gebiet der verwendeten  $\alpha$ -Amylasekonzentrationen beobachtet werden (Abb. 3). Was die  $\beta$ -Amylase an-

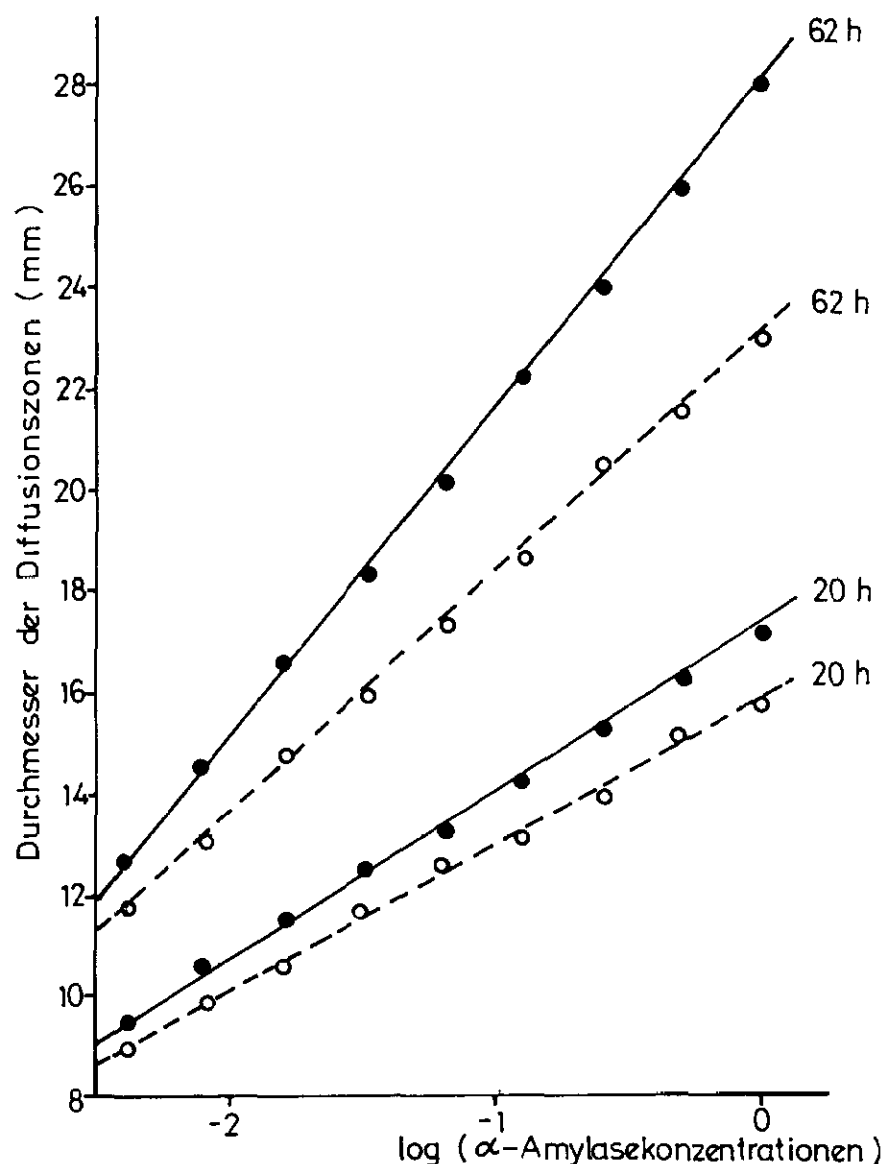


Abb. 3. Graphische Darstellung der Werte der Diffusionszonendurchmesser in Abhängigkeit von den logarithmischen Werten der angewandten  $\alpha$ -Amylasemengen im Falle der mit Amylose (●—●), bzw. mit vernetzter Amylose (○---○) beschickten Platten, nach 20 und 62 h.

belangt, so stellt man ebenfalls eine lineare Abhängigkeit der Diffusionszonendurchmesser von den logarithmischen Werten der betreffenden Enzymkonzentrationen fest, doch nur in den mit einfacher Amylose beschickten Gelplatten. Das Fehlen einer Enzymaktivität der  $\beta$ -Amylase (Exoamylase) in mit vernetzter Amylose beschickten Gelplatten ist auf die Unterbindung der hydrolytischen Einwirkung dieses Enzyms an den durch 2-Chloro-1,3-epoxypropanvernetzung gebildeten Glycerolätherbrücken zurückzuführen (Abb. 4). Diese interkatenaren Querverbindungen führen zu ähnlichen Strukturen, wie sie die Verzweigungspunkte (branching points) aus der Struktur der Stärke darstellen, an denen die  $\beta$ -amylolytische Aktivität unterbrochen wird. Wir möchten hiermit auch erwähnen, daß das Amylopektin (wie auch die Amylose) bekanntlich sowohl für die  $\alpha$ -Amylase, als auch für die  $\beta$ -Amylase ein Substrat darstellt—wie auch zusätzliche, von uns auf Gelplatten ausgeführte Versuche gezeigt haben—zum Unterschied von der durch Glycerolätherbrücken hochvernetzten Amylose X-100, die mit ihrem dichten Netzwerk nur für die  $\alpha$ -Amylase, aber nicht auch für die  $\beta$ -Amylase ein abbauba-

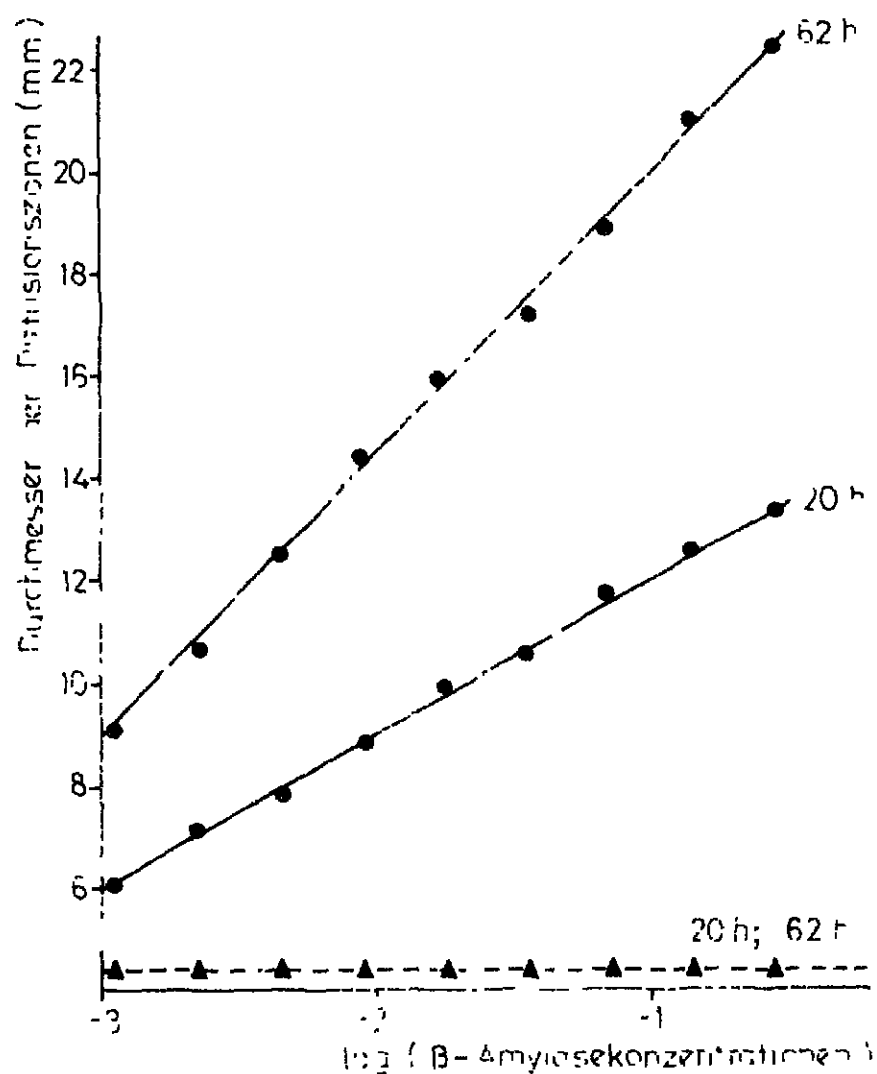


Abb. 4 Graphische Darstellung der Werte der Diffusionszonendurchmesser in Abhängigkeit von den logarithmischen Werten der angewandten  $\beta$ -Amylasekonzentrationen im Falle der mit Amylose (●—●) bzw. mit vernetzter Amylose (▲—▲) beschickten Platten nach 20 und 62 h.

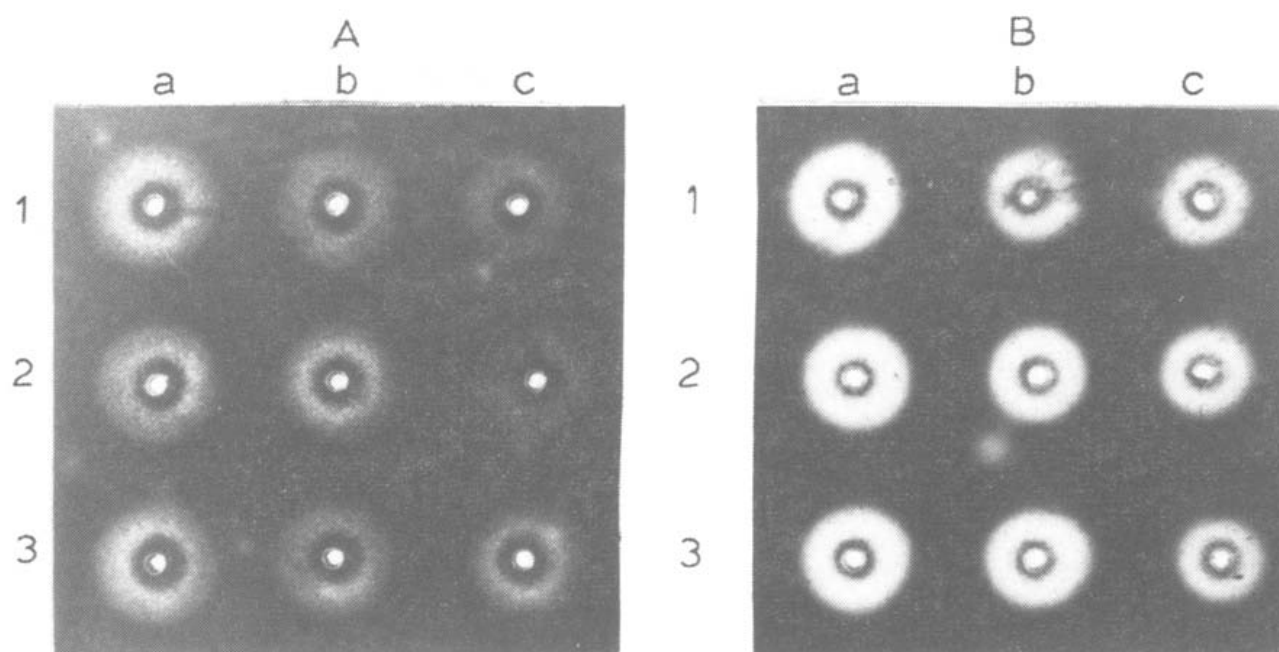


Abb. 5 Diffusionszonen verschiedener  $\alpha$ -Amylasemengen (1 mg/ml (a), 0.5 mg/ml (b), 0.25 mg/ml (c) in Abwesenheit (1) und Gegenwart von 1 mg (2) oder 2 mg Rinderserumalbumin/ml (3) bei mit Amylose (A), bzw. vernetzter Amylose (B) beschickten Gelplatten.

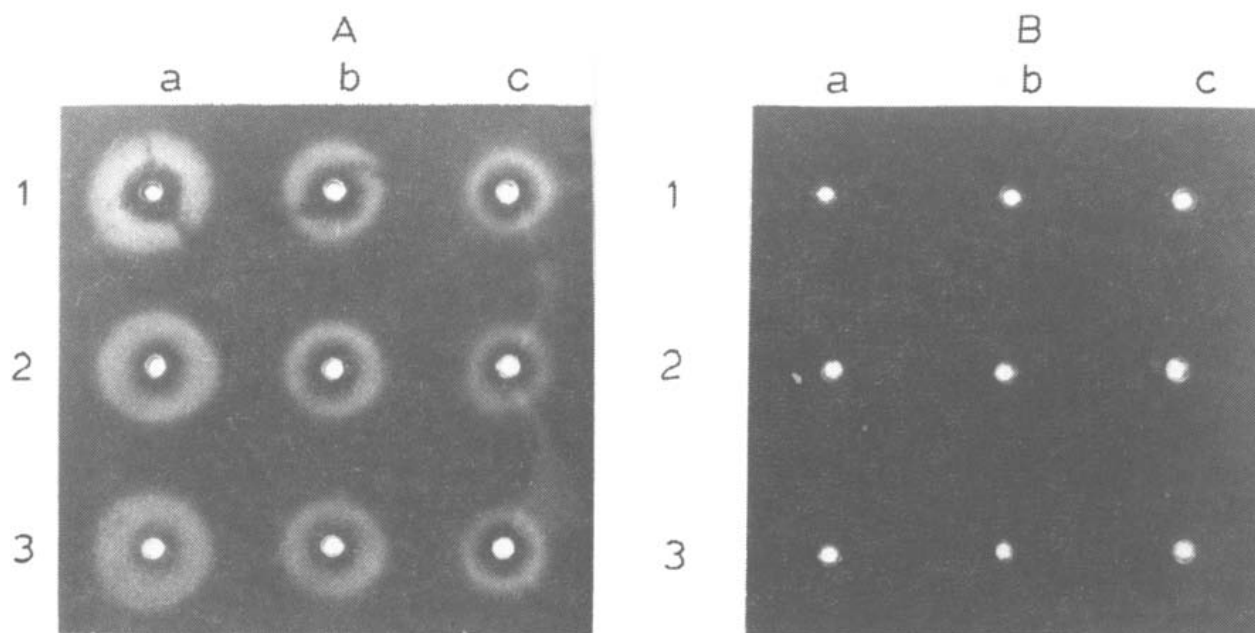


Abb. 6. Diffusionszonen verschiedener  $\beta$ -Amylasemengen 0,28 mg/mL (a), 0,14 mg/mL (b), und 0,07 mg/mL (c) in Abwesenheit (1) und in Gegenwart von 1 mg (2) oder 2 mg Rinderserumalbumin/mL (3) bei mit Amylose (A), bzw. mit vernetzter Amylose (B) beschickten Gelplatten.

res Substrat bildet. Die erzielten Ergebnisse sind in voller Übereinstimmung mit denen aus früheren Arbeiten<sup>14,18</sup>, in welchen gezeigt wurde, daß die vernetzte Amylose nur für die  $\alpha$ -Amylase ein Substrat darstellt und so die selektive Bestimmung dieses Enzyms ermöglicht.

Wird die Diffusionszeit auf 62 h verlängert, so werden dementsprechend grössere Diffusionsdurchmesser erhalten (Abb. 3 und 4). Es ist bekannt, dass Eiweissstoffe—und unter gewissen Bedingungen auch einige Detergentien—auf die  $\alpha$ -Amylase eine aktivierende Wirkung ausüben können, wenn sie durch die gewöhnlichen Methoden bestimmt wird<sup>24</sup>. Um festzustellen, ob dieses auch bei der hier vorgeschlagenen diffusiometrischen Methode der Fall ist, bestimmten wir die Aktivität der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylase auch in Anwesenheit von unterschiedlichen Rinderserumalbuminmengen. So wurde die Aktivität verschiedener  $\alpha$ -Amylasekonzentrationen (0,25–1 mg/mL) in Abwesenheit und Gegenwart von 1 bzw. 2 mg Rinderserumalbumin/mL bestimmt. Bei der  $\beta$ -Amylase lagen die betreffenden Enzymkonzentrationen zwischen 0,07 und 0,28 mg/mL. Aus Abb. 5 und 6 geht hervor, daß die Anwesenheit von Rinderserumalbumin nicht den geringsten Einfluss auf die diffusiometrisch bestimmte Aktivität dieser Enzyme ausübt, auch nicht einmal dann, wenn seine Konzentration die der  $\alpha$ -Amylase um das 8-fache und die der  $\beta$ -Amylase um das 30-fache übersteigt. Dadurch kann diese Methode ohne weiteres zu Serienanalysen von Gesamtproteinextrakten, z.B. bei der Auslese von hochproduktiven amylaseerzeugenden Mikroorganismengruppen oder zu Analysen verschiedener biologischer Flüssigkeiten herangezogen werden.

Bei der Anwendung von Amylose X-100 liegen die Grenzen des vorgeschlagenen Nachweisverfahrens bei 0,05  $\mu$ g Enzym/Probe und sind mit denen anderer radialdiffusiometrischer Methoden vergleichbar. Wird eine Amylose mit dichte-

rem oder loserem Vernetzungsgrad verwendet, verringert sich die Empfindlichkeit der Methode.

## LITERATUR

- 1 G. MANCINI, A. O. GARBONARA UND I. F. HEREMANS, *Immunochemistry*, 2 (1965) 235–254
- 2 C. A. RYAN, *Anal. Biochem.*, 19 (1967) 434–440.
- 3 G. F. B. SCHUMACHER, *J. Reprod. Med.*, 1 (1968) 61–69
- 4 G. F. B. SCHUMACHER, *J. Reprod. Med.*, 3 (1969) 171–178
- 5 K. MOFTTOLNEN, *J. Sci. Food Agric.*, 21 (1970) 261–268
- 6 W. B. SCHILL UND G. F. B. SCHUMACHER, *Anal. Biochem.*, 46 (1972) 502–533.
- 7 G. F. B. SCHUMACHER UND W. B. SCHILL, *Anal. Biochem.*, 48 (1972) 9–26
- 8 H. LOVENSTEIN UND J. H. GILD, *Anal. Biochem.*, 70 (1976) 204–208
- 9 C. MUSOLAN UND S. VASU, *Stud. Cercet. Biochim.*, 20 (1977) 209–221
- 10 V. V. KORSUNOV, *Prikl. Biokhim., Mikrobiol.*, 9 (1973) 877–882
- 11 K. F. McGEENEY, *Isoamylase-S-Type Amylase and P-Type Amylase*, Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Schweden, 1980.
- 12 J. J. MARSHALL, *Anal. Biochem.*, 37 (1970) 466–470.
- 13 J. A. THOMA, J. E. SPRADLIN UND S. DYGERT, in R. D. BOYER (Herg.), *The Enzymes* (3. Aufl.), Bd. 5, Academic Press, New York, 1971, S. 115.
- 14 M. A. MATEESCU, H. D. SCHELL, F. MIHAILESCU UND I. CORNOIU, *Biochimie*, 58 (1976) 875–877.
- 15 M. A. MATEESCU, I. CORNOIU UND H. D. SCHELL, *Anal. Lett.*, 13 (B 18) (1980) 1567–1577.
- 16 M. A. MATEESCU, *Biochimie*, 60 (1978) 535–537.
- 17 M. A. MATEESCU, *Stud. Cercet. Biochim.*, 24 (1981) 175–179.
- 18 H. D. SCHELL, M. A. MATEESCU, T. BENTIA UND A. JIFCU, *Anal. Lett.*, 14 (B 17 & 18) (1981) 1501–1514.
- 19 M. WEBER, M. J. FOGLIETTI UND F. PERCHERON, *Biochimie*, 58 (1976) 1299–1362.
- 20 M. SERBAN, M. A. MATEESCU UND H. D. SCHELL, Rumänische Pat. 61524 (1976)
- 21 M. SERBAN, H. D. SCHELL UND M. A. MATEESCU, *Rev. Roum. Biochim.*, 12 (1975) 187–191
- 22 V. GHETIE UND H. D. SCHELL, *Experientia*, 27 (1971) 1384–1385.
- 23 J. F. ROBYT UND W. J. WHELAN, *Anal. Biochem.*, 45 (1972) 510–516.
- 24 M. D. O'DONNELL UND K. T. McGEENEY, *Enzyme*, 18 (1974) 356–367.