



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

269 748

(21) PV 1899-89.B
(22) Přihlášeno 28 03 89

(40) Zveřejněno 12 09 89
(45) Vydáno 06 02 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
G 01 N 27/40

(75) Autor vynálezu

MAREK MIROSLAV doc. ing. CSc.,
VRBOVÁ EVA ing., PRAHA (CS),
RALYS EDMUNDAS ing. CSc.,
KRANIAUSKAS VYTAUTAS ing., VILNIUS (SU)

(54)

Způsob přípravy enzymové elektrody
na stanovení L-lysinu

(57) Způsob přípravy spočívá v tom, že se 1 až 20 μ l enzymu L-lysinoxidasy o aktivitě 1 až 20 μ kat v 1 ml roztoku enzymu imobilizuje reakcí s 1 až 10 μ l roztoku s 1 až 5 % obj. glutaraldehydu při 4 $^{\circ}$ C po dobu 2 až 7 dní na nylonovou sítku předem aktivovanou parciální hydrolýzou roztokem s 10 až 25 % hmot. kyseliny chlorovodíkové po dobu 2 sekund až 20 minut nebo na kolagenovou membránu předem aktivovanou působením 4 až 6 mol.dm⁻³ močoviny po dobu 1 až 5 dnů a nylonová síťka nebo kolagenová membrána s imobilizovaným enzymem se fixuje na povrch elektrochemického kyslíkového čidla.

Vynález se týká způsobu přípravy enzymové elektrody na stanovení L-lysinu.

Stanovení obsahu L-lysinu, pro člověka esenciální aminokyseliny, je důležitým kritériem vyhodnocení kvality surovin a výrobků zemědělsko-potravinářského komplexu především z hlediska nutriční hodnoty potravin a krmiv. Množství L-lysinu obsažené v hydrolyzátech analyzovaných bílkovin se doposud běžně stanoví pomocí různých chromatografických technik, především ionexovou chromatografií, popřípadě plynovou, papírovou a tenkovrstvou chromatografií bílkovinných hydrolyzátů. Jako klasickou metodu stanovení využitelného L-lysinu v různých surovinách rostlinného i živočišného původu je možno označit působení 2,4-dinitrofluorbenzenu na ϵ -aminoskupinu v bílkovinách obsaženého lysinu s následným fotometrickým stanovením 2,4-dinitrofenylového derivátu L-lysinu v příslušném bílkovinném hydrolyzátu.

Společnou nevýhodou chromatografických metod stanovení lysinu je pracnost a především časová náročnost každé analýsy. Naproti tomu "přímá" kolorimetrická stanovení lysinu jsou pro svoji nízkou specifitu méně přesná. Z tohoto hlediska se jeví jako velmi atraktivní použití enzymů pro jejich vysokou substrátovou i účinkovou specifitu. Reakce katalyzované enzymy probíhají při velmi nízkých koncentracích substrátu s vysokou reakční rychlostí, aniž by vyžadovaly extrémní hodnoty teploty, tlaku nebo pH reakční směsi. Z těchto důvodů je snížena na minimum možnost ovlivnění výsledku analýs tvorbou vedlejších produktů reakce, popřípadě reakcemi jiných složek analyzované směsi látek.

Průběh enzymových reakcí je možno sledovat buď následnými reakcemi, například vzniklých reakčních produktů, nebo s výhodou fyzikálními nebo fyzikálně chemickými metodami. Vedle velmi často používané fotometrie má velký význam spojení enzymových reakcí s elektrochemickými čidly detegujícími substráty, produkty nebo jiné látky ovlivňující průběh enzymových reakcí. Pro stanovení L-lysinu je možno využít dekarboxylačních a oxidačních enzymových reakcí s elektrochemickým sledováním změn koncentrací O_2 , H_2O_2 , CO_2 , H^+ , NH_4^+ , respektive NH_3 .

Použití volných enzymů naráží v některých případech na technické nebo ekonomické problémy jejich získávání, obtížnou regeneraci z reakční směsi, poměrně malou stabilitou některých volných enzymů atd. Tyto problémy jsou postupně řešeny náhradou rozpustných enzymů imobilizovanými enzymy použitelnými pro velký počet analýz. Ve spojení s elektrochemickou detekcí jsou získány biosenzory, se kterými je možno provádět analýzy bez spotřeby chemikálií v tzv. bezreagenční analýze. Velkou výhodou těchto biosenzorů je rychlost, přesnost a reprodukovatelnost stanovení a dále možnost analýzy roztoků barevných, kalných nebo fluoreskujících, kde jsou jiné způsoby detekce obtížné.

Analytická využitelnost biosenzorů je podstatně ovlivněna jejich stabilitou. Jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují stabilitu biosenzorů, je způsob imobilizace enzymů. Imobilizace se nejčastěji provádí zachycením ve struktuře gelu (polyakrylamidového gelu, želatiny, alginátu a podobně), sorpcí ve spojení s následným pokřížením pomocí bifunkčních činidel, popřípadě přímou kovalentní vazbou realizovanou některou z imobilizačních technik na přírodní nebo syntetické membrány, které jsou v těsném styku s elektrochemickým čidlem. Pro stanovení L-lysinu byly připraveny enzymové elektrody na bázi L-lysindekarboxylasy nebo mikroorganismů vykazujících tuto enzymovou aktivitu (*Escherichia coli*, *Bacterium cadaverie*, *Clostridium welchii*, *Lactobacillus casei* a podobně) ve spojení s detekcí vznikajícího oxidu uhličitého pomocí elektrochemického CO_2 - senzoru. Hlavní nevýhodou tohoto typu enzymových, respektive mikrobiálních elektrod je příliš pomalá odezva senzoru potřebná k ustálení rovnováhy při potenciometrickém stanovení CO_2 . Proto byly vyvinuty enzymové elektrody na stanovení L-lysinu obsahující vedle L-lysindekarboxylasy koimobilizovanou diaminoxidasu umožňující amperometrickou detekci k oxidaci vznikajícího diaminu potřebného kyslíku. Oba enzymy byly koimobilizovány na polyamidovou síťku pomocí

glutaraldehydu za přídavku hovězího sérového albuminu. Přídavek diaminoxidasy sice výrazně zkrátí dobu analýsy (možností spojení s kyslíkovým čidlem), na druhou stranu se však značně snížila selektivnost analýsy, protože při stanovení L-lysinu může interferovat celá řada diamínů, které jsou samy o sobě substráty diaminoxidasy. Ke stanovení L-lysinu byla připravena také enzymová elektroda imobilizací L-lysinoxidasy do želatinové membrány. Nevýhodou tohoto druhu enzymové elektrody je způsob imobilizace L-lysinoxidasy, v důsledku kterého se vytváří barierová vrstva želatiny zpomalující rychlost odezvy vlastního kyslíkového čidla, se kterým je želatinová vrstva s imobilizovaným enzymem bezprostředně spojena.

Uvedené nevýhody odstraňuje způsob přípravy enzymové elektrody na stanovení L-lysinu podle vynálezu spočívající v tom, že se 1 až 20 μl enzymu L-lysinoxidasy o aktivitě 1 až 20 $\mu\text{kat/l}$ ml imobilizuje s 1 až 10 μl roztoku s 1 až 5 % obj. glutaraldehydu na předem aktivovanou nylonovou sítku nebo na kolagenovou membránu. Nylonová síťka se aktivuje před imobilizací enzymu parciální hydrolysou roztokem s 10 až 25 % hmot. kyseliny chlorovodíkové po dobu 2 sekund až 20 minut. Kolagenová membrána se aktivuje před imobilizací enzymu působením 4 až 6 mol.dm^{-3} močoviny po dobu 1 až 5 dnů. Nylonová síťka nebo kolagenová membrána s imobilizovaným enzymem se fixuje na povrch elektrochemického kyslíkového čidla.

Způsobem podle vynálezu se s výhodou na aktivovanou nylonovou sítku nebo kolagenovou membránu společně s L-lysinoxidasou koimobilizuje další enzym katalasa o aktivitě 500 až 5 000 $\mu\text{kat/l}$ ml především z důvodu zvýšené stability připraveného biosenzoru. Imobilizace enzymu L-lysinoxidasy je výhodné provádět v přítomnosti 0,1 až 5 μl isokyanidu, například cyklohexylisokyanidu.

Výhodou způsobu přípravy biosenzoru na stanovení L-lysinu podle vynálezu je jednoduchost provedení, vysoká stabilita získaného biosenzoru, dostatečně rychlá odezva a šíře lineární odezvy biosenzoru v závislosti na koncentraci L-lysinu v analyzovaném vzorku.

Vynález je dokumentován příklady použití, aniž by se jimi omezoval.

Příklad 1

Kolagenová membrána byla podrobena 1 dennímu působení 6 mol.dm^{-3} močoviny. Potom byla promyta vodou a 0,1 mol.dm^{-3} fosfátovým pufrům pH 7,5. Na částečně vysušený povrch membrány bylo aplikováno 10 μl L-lysinoxidasy o aktivitě 2,07 $\mu\text{kat.cm}^{-3}$ a 10 μl 2,5 % (hmotn.) glutaraldehydu. Po 72 hodinovém působení při 4 $^{\circ}\text{C}$ byla membrána důkladně promyta 0,1 mol.dm^{-3} fosfátovým pufrům pH 7,5. Membrána s imobilizovanou L-lysinoxidasou byla potom fixována na povrchu kyslíkového čidla.

Příklad 2

Nylonová síťka byla ponořena na 2 sekundy do 25 % hmot. kyseliny chlorovodíkové a potom ihned promyta vodou a 0,1 mol.dm^{-3} fosfátovým pufrům pH 7,5. Na takto aktivovanou síťku bylo aplikováno 5 μl L-lysinoxidasy o aktivitě 5 $\mu\text{kat.cm}^{-3}$, 5 μl 2,5 % hmot. glutaraldehydu a 1 μl cyklohexylisokyanidu. Po 48 hodinovém působení při 4 $^{\circ}\text{C}$ byla síťka promyta 0,1 mol.dm^{-3} fosfátovým pufrům pH 7,5 a potom byla fixována na povrchu kyslíkového čidla.

Příklad 3

Na nylonovou síťku aktivovanou 20 minutovým působením 10 % hmot. kyseliny chlorovodíkové bylo po jejím promytí vodou a 0,1 mol.dm^{-3} fosfátovým pufrům pH 7,5 aplikováno 20 μl L-lysinoxidasy o aktivitě 1 $\mu\text{kat.cm}^{-3}$, 10 μl katalasy o aktivitě 2 mkat.cm^{-3} a 2 μl cyklohexylisokyanidu. Po 2 dnech reakce při 4 $^{\circ}\text{C}$ byla síťka promyta 0,1 mol.dm^{-3}

fosfátovým puforem pH 7,5 a potom byla fixována na povrchu kyslíkového čidla.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy enzymové elektrody na stanovení L-lysinu, vyznačující se tím, že se 1 až 20 μ l enzymu L-lysinoxidasu o aktivitě 1 až 20 μ kat v 1 ml roztoku enzymu imobilizuje reakcí s 1 až 10 μ l roztoku s 1 až 5 % obj. glutaraldehydu při 4 °C po dobu 2 až 7 dní na nylonovou síťku předem aktivovanou parciální hydrolýzou roztokem s 10 až 25 % hmot. kyseliny chlorovodíkové po dobu 2 sekund až 20 minut nebo na kolagenovou membránu předem aktivovanou působením 4 až 6 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ močoviny po dobu 1 až 5 dnů a nylonová síťka nebo kolagenová membrána s imobilizovaným enzymem se fixuje na povrch elektrochemického kyslíkového čidla.
2. Způsob přípravy enzymové elektrody na stanovení L-lysinu podle bodu 1, vyznačující se tím, že se imobilizace enzymu L-lysinoxidasu provádí za přítomnosti 0,1 až 5 μ l isokyanidu, například cyklohexylisokyanidu.
3. Způsob přípravy enzymové elektrody na stanovení L-lysinu podle bodů 1 a 2, vyznačující se tím, že se na nylonovou síťku nebo kolagenovou membránu koimobilizuje 0,5 až 10 μ l enzymu katalasy o aktivitě 500 až 5 000 μ kat v 1 ml.