



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 218 907 A1

4(51) C 12 Q 1/34
G 01 N 27/26

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP C 12 Q / 253 958 1	(22)	15.08.83	(44)	20.02.85
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD

(72) Scheller, Frieder, Dr. rer. nat. habil. Dipl.-Chem.; Strnad, Galina, Dipl.-Ing.; Renneberg, Reinhard, Dr. rer. nat. Dipl.-Biochem., DD

(54) Verfahren zur Aktivitätsbestimmung von Hydrolasen mittels elektrochemischer Anzeige

(57) Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Bestimmung von Hydrolaseaktivitäten. Ziel der Erfindung ist es, die Aktivitätsbestimmung durch Verwendung billiger Substrate, die Einsparung einer enzymatischen Hilfsreaktion und durch einfache Handhabung zu rationalisieren. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur elektrochemischen Aktivitätsbestimmung von Hydrolasen zu entwickeln. Die erfindungsgemäße Lösung der Aufgabe erfolgt durch ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß makromolekulare mit elektrodenaktiven Gruppen modifizierte Substrate mit Hydrolasen zur Umsetzung gebracht werden und die elektrochemische Aktivität der Spaltprodukte an einer amperometrischen oder tensammetrischen Elektrode gemessen wird. Die Erfindung wird in der mikrobiologischen Industrie angewendet.

Dr. F. Scheller
G. Strnad
Dr. R. Renneberg

"Verfahren zur Aktivitätsbestimmung von Hydrolasen mittels elektrochemischer Anzeige"

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Aktivitätsbestimmung von Hydrolasen mittels elektrochemischer Anzeige. Das erfindungsgemäße Verfahren ist besonders für den Einsatz in der mikrobiologischen Industrie geeignet.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Enzymaktivität von Hydrolasen wird nach dem chromolytischen Verfahren durch die Spaltung gefärbter niedermolekularer Substratanaloga oder chromophoretragender hochmolekularer Substrate photometrisch bestimmt. Dieses Verfahren erfordert das Ausfällen des Enzyms zum Abstoppen der Reaktion und das anschließende Zentrifugieren. Saccharogene Methoden für Amylasen, Zellulosen oder Pektinasen weisen die entstandenen Bruchstücke mittels angekoppelter Enzymreaktionen nach, an die eine farbstoffbildende Reaktion angekoppelt ist. Hier tritt ein hoher Reagenzienverbrauch ein, der diese Verfahren unökonomisch macht. Es wurde bereits beschrieben, für diese Zwecke Enzymelektroden einzusetzen (Pfeiffer et al. Anal. Lett. 13, 1179 (1980), Scheller et al. DD 142 248).

Hier treten aber Störungen der Messung durch Beimengungen an Mono- und Oligosacchariden auf.

Die weiterhin gebräuchliche Jod-Stärke-Reaktion zur Amylasebestimmung sowie die Viskosimetrie bei Pektinasen liefern sehr ungenaue Werte (Hempel, J., H. Ruttloft Nahrung 17 (1973) 749).

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, die Aktivitätsbestimmung von Hydrolasen durch die Verwendung billiger makromolekularer Substrate, durch die Einsparung einer enzymatischen Hilfsreaktion und durch einfachere Handhabbarkeit zu rationalisieren. Weiterhin soll eine hohe Empfindlichkeit und gute Präzision der Aktivitätsbestimmung erzielt werden.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Verfahren zur elektrochemischen Aktivitätsbestimmung von Hydrolasen zu entwickeln.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, daß makromolekulare mit elektrodenaktiven Gruppen modifizierte Substrate, die ggf. an einer festen Phase fixiert sind, mit Hydrolasen zur Umsetzung gebracht werden und die elektrochemische Aktivität der Spaltprodukte an einer amperometrischen oder tensammetrischen Elektrode gemessen wird. Zweckmäßigerweise werden dabei die niedermolekularen, grenzflächenaktiven Spaltprodukte durch Eintauchen der Meßelektrode in das Meßgefäß bereits während der Inkubation der Hydrolasen adsorptiv an der Elektrodenoberfläche angereichert.

Insbesondere ist es durch die Erfindung möglich, die Aktivität der Hydrolasen Protease, Amylase, Cellulase oder Pektinase zu bestimmen. Als modifizierte makromolekulare Substrate werden erfindungsgemäß vernetzte oder unvernetzte Stärke, Cellulose oder Pektine eingesetzt, die mit Chinon-, Hydrochinon-, Diazogruppen, Metallchelaten oder Redoxindikatoren modifiziert sind.

Günstig für die Durchführung des Verfahrens ist es, unlösliche Substrate einzusetzen oder die in der Meßeinrichtung vorhandenen Flächen, wie Gefäßwand, Rührer für die Fixierung der Substrate zu nutzen. Allerdings können noch zusätzliche Form-

körper anwesend sein, wie Perlen aus Glas oder Kunststoff, an deren Oberflächen die Substrate fixiert sind.

Im folgenden soll das Verfahren noch näher erläutert werden: Bei der Inkubation wird die Hydrolase enthaltende Meßprobe mit einem Puffer, der das jeweilige pH-Optimum besitzt, verdünnt, danach in die temperierte Meßzelle eingefüllt und während der Vorinkubation mit einem Magnetrührer umgewälzt. Das immobilisierte Substrat wird erst nach Einführen der Indikator- und Gegenelektrode in die Meßlösung gegeben. Die tensammetrische Anzeige mittels tropfender Quecksilberelektrode oder mit einer Festelektrode, z. B. aus Nickel, wird für solche Substrate benutzt, wo die elektrodenaktive Gruppe polarographisch reversibel umgesetzt wird, d. h. im Wechselstrompolarogramm ein faradayscher Peak vorliegt z. B. bei Chinon oder Metallchelaten. Bei diesem Meßprinzip erfolgt keine Entlüftung der Meßlösung. Die amperometrische Anzeige wird bei diazogruppen- oder hydrochinongruppentragenden Substraten eingesetzt, wobei die ersteren Bruchstücke in der entlüfteten Meßlösung an der Quecksilberelektrode erfaßt werden. Die amperometrische oder tensammetrische Messung erfolgt nach einer Inkubationszeit von 1 - 30 min.

Die Bestimmung der Hydrolaseaktivität erfolgt als Relativmessung und bezieht sich auf die Kalibrierung mit Standardlösungen bekannter Aktivität.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Hydrolasen besitzt gegenüber den bisherigen Verfahren folgende Vorteile:

- die direkte elektrochemische Anzeige der Spaltprodukte im Reaktionsgemisch eliminiert
- die Notwendigkeit zusätzlicher enzymatischer Hilfsreaktionen der saccharogenen Methode bzw. von Arbeitsschritten wie Ausfällen und anschließendes Abzentrifugieren bei dem chromatolytischen Verfahren. Es ist einfach durchführbar und liefert eine gute analytische Qualität.

Ausführungsbeispiele

Die Erfindung soll nachstehend an zwei Ausführungsbeispielen erläutert werden.

Beispiel 1

In Verbindung mit einer temperierbaren Meßzelle wird der Polarographie Analyzer Modell 174A verwendet, wobei die Meßkette charakterisiert ist durch: Arbeitselektrode (Quecksilbertropfelektrode mit einer Tropfzeit von 2 s), Bezugselektrode (SCE) sowie Gegenelektrode (Bodenquecksilberelektrode). In der Zelle befinden sich 5 bzw. 10 ml Grundlösung (0,066 M Phosphatpuffer, pH 8,0). Darin gelöster Sauerstoff wird mit gereinigtem Stickstoff entfernt. Die Meßlösung wird auf $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ temperiert.

Zunächst wird ein differentielles Pulspolarogramm mit einer Azokaseinmenge aufgenommen, die die Sättigung der Elektrodenoberfläche bewirkt. Das bedeutet, daß oberhalb dieser Konzentration keine Peakstromänderung ($E_p = -450 \text{ mV vs. SCE}$) erfolgen kann. Dieser Wert beträgt $3,0 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ und ist größer als der scheinbare K_M -Wert.

Nunmehr läßt sich diese Substratmenge mit verschiedenen Trypsinmengen versetzen. Nach kurzer Inkubationszeit (5 min) wird erstmalig die Peakstromerhöhung gemessen, die durch die Reduktion der entstandenen niedermolekularen azogruppentragenden Spaltprodukte hervorgerufen wird. Diese Stromerhöhung ist in einem Bereich der Enzymkonzentration proportional. Ein Anstieg des Peakstromes ist schon bei einer Enzymkonzentration von $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ U/ml}$ nachweisbar. Eine lineare Abhängigkeit des anfänglichen Peakstromanstiegs von der zugesetzten Enzymmenge zeigt sich bis maximal $7,0 \cdot 10^{-3} \text{ U/ml}$. Damit ist es möglich, die Trypsinaktivität im Bereich von 0,5 bis $7,0 \cdot 10^{-3} \text{ U/ml}$ zu bestimmen.

Beispiel 2

Es wird mit der gleichen Meßkette wie in Beispiel 1 gearbeitet, aber die Tensammetrie benutzt (Amplitude = 10 mV 78 Hz). Als Grundlösung dienen 0,066 M Phosphatpuffer, pH 6,5. Die Meßlösung wird auf $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ temperiert. Mit Cibacron-Blau modifizierte und zusätzlich quervernetzte Stärke (blue starch) wird als Suspension der Meßlösung zugesetzt.

Das Substrat zeigt bei der Aufnahme des Wechselstrompolarogramms im Potentialbereich -400 bis -900 mV bei pH 6,5 keinen Peakstrom.

Nach der Einwirkung bakterieller α -Amylase (0,5 I. U.) auf die Stärke-Suspension (2 mg/ml) wird ein Peakstrom registriert ($E_p = -650$ mV), der innerhalb 15 min linear mit der Zeit ansteigt. Die Bildungsgeschwindigkeit des Spaltprodukts hängt direkt von der Amylaseaktivität ab.

Mittels einer Kolibrierungsmessung kann die Amylase-Aktivität in unbekannten Probelösungen bestimmt werden.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Hydrolasen mittels elektrochemischer Anzeige, gekennzeichnet dadurch, daß makromolekulare mit elektrodenaktiven Gruppen modifizierte Substrate, die ggf. an einer festen Phase fixiert sind, mit Hydrolasen zur Umsetzung gebracht werden und die elektrochemische Aktivität der Spaltprodukte an einer amperometrischen oder tensammetrischen Elektrode gemessen wird, wobei die entstehenden niedermolekularen, grenzflächenaktiven Spaltprodukte durch Eintauchen der Meßelektrode in das Meßgefäß bereits während der Inkubation der Hydrolasen adsorptiv an der Elektrodenoberfläche angereichert werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Hydrolasen Proteasen, Amylasen, Cellulasen oder Pektinasen sind.
3. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die modifizierten makromolekularen Substrate vernetzte oder unvernetzte Stärke, Cellulose oder Pektine sind, die mit Chinon-, Hydrochinon-, Diazogruppen, Metallchelaten oder Redoxindikatoren modifiziert sind.
4. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß als feste Phase für die Fixierung der makromolekularen Substrate, die in der Meßeinrichtung vorhandenen Flächen, wie Gefäßwand, Rührer oder zusätzlich eingebrachte Formkörper mit großer Oberfläche dienen.