

RZECZPOSPOLITA  
POLSKA



Urząd Patentowy  
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **213396**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **391096**

(51) Int.Cl.

**G01N 33/02 (2006.01)**

**G01N 33/18 (2006.01)**

**G01N 31/22 (2006.01)**

(22) Data zgłoszenia: **29.04.2010**

(54)

**Bioczułnik do wykrywania związków fenolowych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

**07.11.2011 BUP 23/11**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

**28.02.2013 WUP 02/13**

(73) Uprawniony z patentu:

**POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**JOANNA CABAJ, Wołów, PL**

**KRZYSZTOF IDZIK, Legnica, PL**

**JADWIGA SOŁODUCHO, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Katarzyna Paprzycka**

**PL 213396 B1**

## Opis patentowy

Przedmiotem wynalazku jest bioczuJNIK, przeznaczony do wykrywania fenolu i jego pochodnych w przemyśle spożywcym oraz w środowisku wodnym.

BioczuJNIKI są powszechnie stosowane w technologiach przemysłowych, spożywczych i w ochronie środowiska. Składają się z części biologicznej i części aparaturowej przetwarzającej sygnał odebrany przez element biologiczny. BioczuJNIKI mogą być oparte na receptorach chemicznych, immunologicznych lub biokatalitycznych.

Znane są biosensory warstwowe otrzymane z wykorzystaniem różnych technik samoorganizacji cząstek na powierzchni z kwasów tłuszczowych, fosfolipidów lub porfiryń. Tego typu systemy stanowią podstawę do budowy biosensorów oraz biologicznych sensorów optycznych. Znane są innego rodzaju czuJNIKI enzymatyczne, których konstrukcja oparta jest o na modyfikacji elektrod (np. platynowe lub węglowe) za pomocą polimerów przewodzących oraz odpowiednich enzymów.

Z europejskiego zgłoszenia patentowego nr EP2083015 znane są biosensory, których część biologicznie aktywna wiązana jest kowalencyjnie w porowatych polipeptydach tworząc charakterystyczne układy poro-sensorowe. Z amerykańskiego patentu nr US7572356 znany jest jednoelektrodowy biosensor zbudowany z użyciem membrany do dializ. BioczuJNIK tego typu posiada elektrodę pokrytą filmem otrzymanym z mieszaniny hydrofilowego polimeru przewodzącego oraz enzymu. Z międzynarodowego zgłoszenia patentowego nr WO2009140343 znany jest elektrochemiczny biosensor do oznaczania stężenia hemoglobiny we krwi. Kolejnym elektrochemicznym biosensorem, dającym odpowiedź amperometryczną jest układ elektrod modyfikowanych ureazą i iminohydrolazą kreatyninową opisany w amerykańskim zgłoszeniu patentowym nr US 2010025265.

Z europejskiego zgłoszenia nr EP2082038 znany jest sensor biologiczny do wykrywania toluenu i ksylenu zbudowany z transformowanych szczepów *Acinetobacter baylyi adp1*. Z chińskiego zgłoszenia patentowego nr CN101592626 znany jest warstwowy biosensor, w którym chemoczułą warstwę stanowi metal. Tego typu biosensor jest trwały i charakteryzuje go silniejszy sygnał pomiarowy. W wynalazku według europejskiego zgłoszenia patentowego nr EP1828759 mediacyjny charakter rutynowych kompleksów został wykorzystany w konstrukcji warstwowych biosensorów, w których białka enzymatyczne były unieruchamiane w przewodnikowych względnie półprzewodnikowych warstwach węglowych. Z amerykańskiego zgłoszenia nr US2010047670 znana jest węglowa elektroda modyfikowana warstwą fosfolipidową oraz dehydrogenazą glukozową. Tego typu układ znalazł zastosowanie w ogniwie paliwowym. Również z amerykańskiego zgłoszenia patentowego nr US2010040909 znane są nowoczesne ogniwa wykorzystujące mikroorganizmy, które czerpią paliwo z atmosfery z CO<sub>2</sub>. Znane są również elektrody modyfikowane suchym układem fosfolipidy-białko opisane w europejskim zgłoszeniu patentowym nr EP2135943. Tego typu elektrody służą do immobilizacji np. biokatalizatorów, komórkowych organelli, wirusów. Z polskiego zgłoszenia patentowego nr P381953 znany jest warstwowy bioczuJNIK do wykrywania związków fenolowych w środowisku wodnym. Czujnik ma warstwę aktywną w postaci białka-lakazy zimmobilizowanej w filmie Langmuira-Blodgett (LB) otrzymanym z *N*-heptylo-3,6-bis(tiofeno)karbazolu, kwasu 22-trikozenowego i aldehydu glutarowego. Zimmobilizowane, korzystnie kowalencyjnie, białko-lakaza wykazuje dużą czułość na obecność fenolu oraz sól sodową kwasu 2,2'-azyno-bis-3-etylobenzeno-tiazolo-6-sulfonowego w roztworze wodnym.

W ostatnich latach coraz częściej elektrochemiczne elektrody modyfikowane są za pomocą białek enzymatycznych w celu konstrukcji selektywnych urządzeń diagnozujących substancje toksyczne w środowisku. W systemie tego typu białka są kowalencyjnie i adsorpcyjnie wiązane do układów kopolimerowych pokrywających elektrodę.

Istotę bioczuJNIKA do wykrywania związków fenolowych według wynalazku stanowi czujnik zawierający warstwę aktywną w postaci lakazy zimmobilizowanej kowalencyjnie na powierzchni elektrochemicznego filmu otrzymanego z kopolimeru w skład którego wchodzi kwas tiofenokarboksyłowy, 3-metylotiofen oraz *N*-butylo-3,6-bis(3,4-etylenodioksytiofeno)karbazol.

Korzystnie bioczuJNIK utworzony jest z równomolowej mieszaniny kwasu tiofenokarboksyłowego, 3-metylotiofenu oraz *N*-butylo-3,6-bis(3,4-etylenodioksytiofeno)karbazolu oraz lakazy.

Korzystnie lakaza zimmobilizowana jest na powierzchni elektrochemicznego filmu za pomocą słabych oddziaływań Van der Waalsa.

BioczuJNIK według wynalazku wytworzony jest z ultracienkiego filmu elektrochemicznego i nadaje się do wykrywania fenolu i jego toksycznych pochodnych w środowisku wodnym oraz w przemyśle spożywcym. Zaletą bioczuJNIKA jest jego bardzo duża czułość i fakt, że nadaje się do wykrywania

różnych stężeń, a także jego szeroka aktywność substratowa. Nie bez znaczenia jest również dość długa żywotność zimmobilizowanego białka, które zachowuje swoją katalityczną aktywność w ciągu kolejnych trzydziestu cykli reakcyjnych tj. około 4 miesiące. Warstwa elektrochemicznego filmu z immobilizowaną lakazą według wynalazku i powtarzalność otrzymanych wyników oraz różne odpowiedzi czujnika zbudowanego z kopolimeru w skład którego wchodzi kwas tiofenokarboksylowy, 3-metylotiofen oraz *N*-butylo-3,6-bis(3,4-etylenodioksytiofeno)karbazol, na różne stężenia związków fenolowych, typują ten materiał do budowy czujników stosowanych w diagnostyce środowiska.

Przedmiot wynalazku jest wyjaśniony w przykładzie realizacji i na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia schemat pracy bioczujujnika, fig. 2 - wykres zależności aktywności lakazy unieruchomionej w elektrochemicznym filmie mierzonej wzrostem natężenia płynącego prądu od zmiany przyłożonego napięcia, fig. 3 - wykres zależności aktywności lakazy unieruchomionej w elektrochemicznym filmie mierzonej wzrostem natężenia płynącego prądu od zmiany przyłożonego napięcia w obecności tlenu.

#### P r z y k ł a d

Bioczujujnik zawierająca lakazę immobilizowaną kowalencyjnie w elektroprzewodzącym filmie otrzymano z kopolimeru wytworzonego z równomolowej mieszaniny kwasu tiofenokarboksylowego, 3-metylotiofenu oraz *N*-butylo-3,6-bis(3,4-etylenodioksytiofeno)karbazolu **P** w wyniku elektrodepozycji lakazy na węglowej elektrodzie **C** modyfikowanej polimerem przewodzącym **P**. Proces elektrodepozycji białka **B** na modyfikowanej elektrodzie pracującej prowadzono galwanostatycznie przy napięciu równym 250  $\mu$ A w 0,1 M roztworze elektrolitu - LiClO<sub>4</sub> w buforze octanowym o pH 5,0 **E**. Następnie bioczujujnik według wynalazku wprowadzono do naczynia pomiarowego, o pojemności 50 ml zaopatrzonego w układ dwóch elektrod: elektrodę kalomelową (SCE) jako elektrodę odniesienia **Eo** oraz cylindryczną elektrodę platynową jako elektrodę pomocniczą **Ep**. Do pomiaru aktywności zimmobilizowanego białka użyto 0,25 mM hydrochinonu jako substratu, reakcję katalityczną prowadzono w warunkach beztlenowych i utlenionych przepuszczając przez roztwór prąd w zakresie napięć -200 - 1000 mV. Proces i pomiar aktywności zimmobilizowanego białka prowadzono w temperaturze pokojowej w 0,1 molowym buforze octanowym o pH 5,0. Zmianę natężenia prądu notowano przy użyciu galwanostatu/potencjostatu ELECTROCHEMA. Układ pomiarowy w trakcie prowadzonego procesu zmieniał sygnał chemiczny na mierzalny sygnał amperometryczny.

Aktywność lakazy zimmobilizowanej, przedstawiono na fig. 2 jako funkcję natężenia prądu w zależności od wzrastającego napięcia, w obecności hydrochinonu jako substratu. Omawiane badania nad aktywnością lakazy były wykonywane przy zastosowaniu hydrochinonu i soli sodowej kwasu 2,2'-azyno-bis-3-etylobenzo-tiazolo-6-sulfonowego (ABTS-u) jako substratów. Przedstawiony na fig. 3 wykres uwidacznia istotny wpływ tlenu na katalityczne właściwości białka.

Z przeprowadzonych badań wynika, że obecność kopolimeru zbudowanego z kwasu tiofenokarboksylowego, 3-metylotiofenu oraz *N*-butylo-3,6-bis(3,4-etylenodioksytiofeno)karbazolu ze względu na mediacyjny charakter elektroprzewodzącego układu, usprawnia transport elektronów, przez co znacznie poprawia aktywność katalityczną unieruchomionego białka.

Długość życia zimmobilizowanego białka według wynalazku wynosi, co najmniej 4 miesiące. Stała, wysoka zdolność utleniania substratu zachowana jest przez kolejnych 30 cykli reakcyjnych. Aktywność białka zimmobilizowanego w filmie stanowi około 85% aktywności użytego do immobilizacji białka natywnego.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Bioczujujnik do wykrywania związków fenolowych, zawierający białkową warstwę aktywną - lakazę zimmobilizowaną w elektrochemicznym filmie osadzoną na elektrodzie węglowej, **znamienny tym**, lakaza zimmobilizowana jest kowalencyjnie na powierzchni elektrochemicznego filmu otrzymanego z kopolimeru w skład którego wchodzi kwas tiofenokarboksylowy, 3-metylotiofen i *N*-butylo-3,6-bis(3,4-etylenodioksytiofeno)karbazol.

2. Bioczujujnik, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że utworzony jest z równomolowej mieszaniny kwasu tiofenokarboksylowego, 3-metylotiofenu, *N*-butylo-3,6-bis(3,4-etylenodioksytiofeno)karbazolu oraz lakazy.

3. Bioczujujnik, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że lakaza zimmobilizowana jest na powierzchni elektrochemicznego filmu za pomocą słabych oddziaływań Van der Waalsa.

## Rysunki

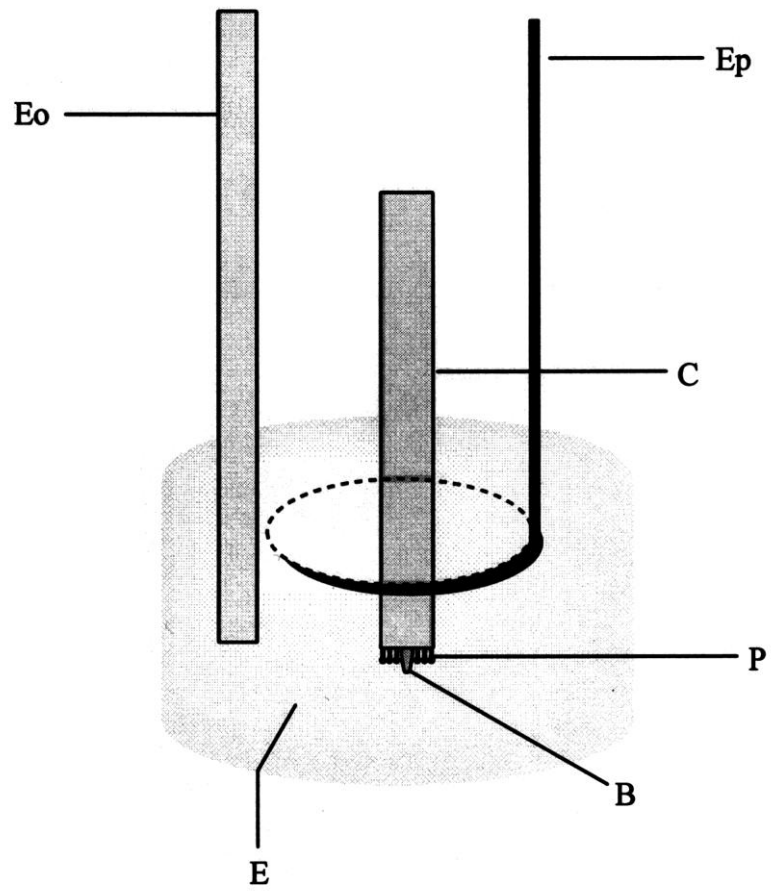


Fig. 1

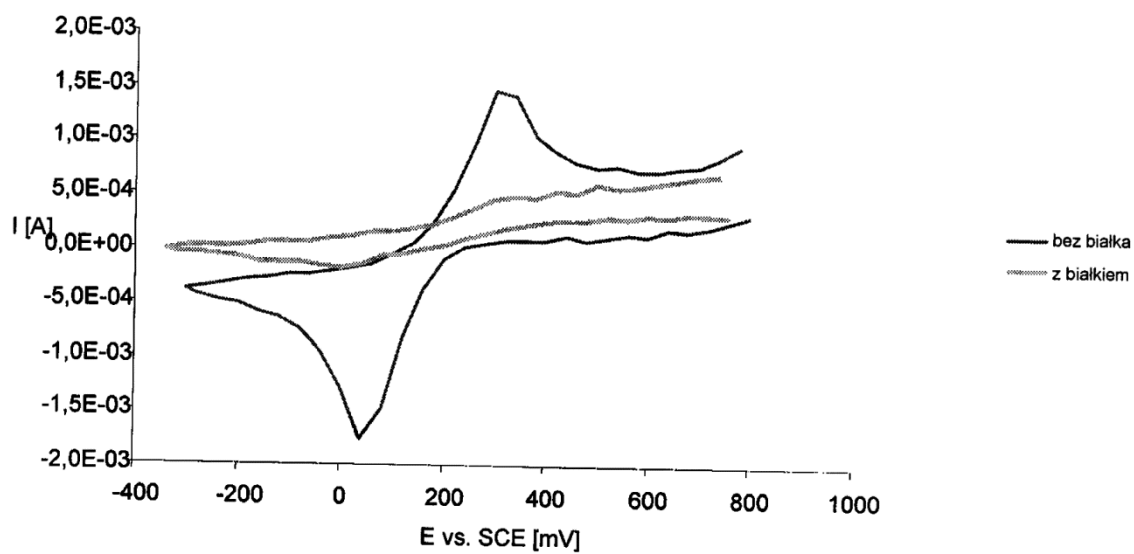


Fig. 2

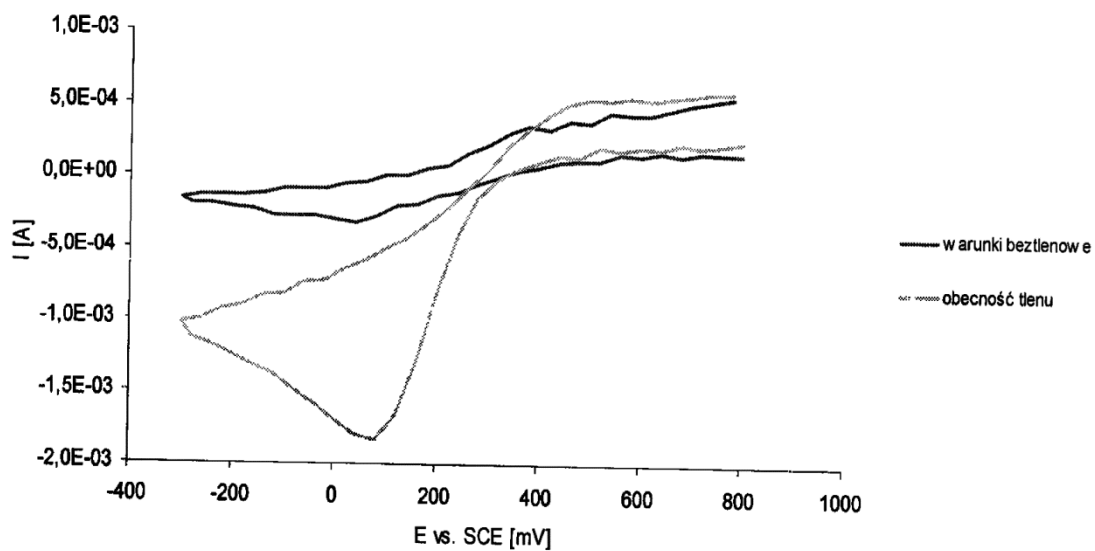


Fig. 3

