

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL**

(11) **222326**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **399875**

(22) Data zgłoszenia: **09.07.2012**

(51) Int.Cl.

G01N 33/02 (2006.01)

G01N 27/416 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

(54)

Elektroda enzymatyczna do wykrywania związków fenolowych

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

17.12.2012 BUP 26/12

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

29.07.2016 WUP 07/16

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

JOANNA CABAJ, Wołów, PL

JADWIGA SOŁODUCHO, Wrocław, PL

AGNIESZKA JĘDRYCHOWSKA, Wrocław, PL

KAMILA OLECH, Żórawina, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Meissner

PL 222326 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest elektroda enzymatyczna do wykrywania związków fenolowych znajdująca zastosowanie w przemyśle spożywczym.

Znane są elektrody enzymatyczne modyfikowane za pomocą warstw otrzymanych z wykorzystaniem, różnych technik samoorganizacji cząstek.

Powszechnie znane są biosensory, których czułe elementy stanowią oksydoreduktazy kapsułkowane w liposomach i immobilizowane na powierzchni porowatych elektrod węglowych. Tego typu elektrody enzymatyczne pełnią rolę biocujników oraz elementów bioogniw paliwowych i znane są z chińskiego zgłoszenia patentowego CN102124598.

Ze amerykańskiego zgłoszenia patentowego US2012129725 znany jest biosensor do wykrywania stężenia ATP w próbkach biologicznych. Układ tego typu wytworzony jest z poliakryloamidu oraz immobilizowanego enzymu.

Innym biosensorem znanym z europejskiego zgłoszenia patentowego EP2441834 jest czujnik fluorescencyjny wytworzony z hydrolaz izolowanych z drożdży, tego typu układ służy do detekcji oraz rozkładu fosforowych związków organicznych.

Z kolejnego amerykańskiego zgłoszenia patentowego US2012052018 znany jest sensor do wykrywania glukozy *in vivo* w próbkach biologicznych. Tego typu sensor wytworzony jest między innymi z kumaryny, ksantenu, kwasu borowego.

Z japońskiego zgłoszenia patentowego JPS5041999 znany jest biocujnik wykrywający obecność metanolu w badanych próbkach win. Chemiluminescencyjny czujnik wykorzystuje w swym działaniu reakcję katalizowaną przez oksydazę alkoholową.

Z publikacji *Electrochromic devices and thin film transistors from a new family of ethylenedioxythiophene based conjugated polymers* Zhongtao Li, Yuan Zhang, Amanda L. Holt, Borys P. Kolasa, Justin G. Wehner, b Andreas Hampp, New J.Chem, 2011,35 Guillermo C. Bazan, Thuc-Quyen Nguyen and Daniel E. Morse znany jest poli(3,4-etylenodioksytiofeno-*alt*-9,9-didodecylofluorenu) oraz sposób jego wytwarzania,

W ostatnich latach coraz częściej elektrochemiczne elektrody modyfikowane są za pomocą białek enzymatycznych w celu konstrukcji selektywnych urządzeń analizujących różne substancje w przemyśle spożywczym, w systemie tego typu białka są adsorpcyjnie związane do układów kopolimerowych pokrywających elektrodę.

Istotą elektrody enzymatycznej do wykrywania związków fenolowych według wynalazku jest to, że zawiera białkową warstwę aktywną w postaci lakazy zimmobilizowanej adsorpcyjnie na powierzchni elektrochemicznego filmu, otrzymanego z kopolimeru w skład, którego wchodzi kwas tiofeno-octowy, 3-metylotiofen oraz oligomer poli(3,4-etylenodioksytiofeno-*alt*-9,9-didodecylofluorenu).

Korzystnie elektroda utworzona jest z równomolowej mieszaniny z kwasu tiofeno-octowego, 3-metylotiofenu oraz oligomeru poli(3,4-etylenodioksytiofeno-*alt*-9,9-didodecylofluorenu) oraz lakazy.

Zaletą elektrody enzymatycznej jest jej duża czułość i fakt, że nadaje się do wykrywania różnych stężeń, a także jej szeroka aktywność substratowa. Nie bez znaczenia jest również dość długa żywotność zimmobilizowanego białka, które zachowuje swoją katalityczną aktywność w ciągu kolejnych dwudziestu cykli reakcyjnych (3 miesiące). Enzymatyczna warstwa bioaktywna według wynalazku i powtarzalność otrzymanych wyników oraz różne odpowiedzi czujnika zbudowanego z kopolimeru w skład którego wchodzi kwas tiofeno-octowy, 3-metylotiofen oraz oligomer poli(3,4-etylenodioksytiofeno-*alt*-9,9-didodecylofluorenu), na różne stężenia związków fenolowych, typują ten materiał do budowy czujników stosowanych w przemyśle spożywczym.

Przedmiot wynalazku jest wyjaśniony w przykładzie realizacji i na rysunku, na którym fig. 1 przedstawia schemat pracy elektrody enzymatycznej, fig. 2-wykres zależności aktywności białka unieruchomionego w elektroprzewodzącym filmie mierzonej wzrostem natężenia płynącego prądu od zmiany przyłożonego napięcia.

P r z y k ł a d I

Elektroda enzymatyczna zawierająca lakazę immobilizowaną adsorpcyjnie w elektroprzewodzącym kopolimerze wytworzonym z kwasu tiofeno-octowego, 3-metylotiofenu oraz oligomeru poli(3,4-etylenodioksytiofeno-*alt*-9,9-didodecylofluorenu) (**P**) powstała w wyniku elektrolitycznej depozycji lakazy na platynowej elektrodzie (**Pt**) modyfikowanej polimerem przewodzącym (**P**). Proces elektrodopozycji białka (**B**) na modyfikowanej elektrodzie pracującej prowadzono galwanostatycznie przy gęstości płynącego prądu 3 mA/cm² w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,25 w czasie 10 minut.

Następnie biosensor białkowy według wynalazku wprowadzono do naczynia pomiarowego, o pojemności 10 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 0,228 mM ABTS jako substratu, reakcję katalityczną prowadzono w warunkach beztlenowych, przepuszczając przez roztwór prąd w zakresie napięć 300–1200 mV. Proces i pomiar aktywności zimmobilizowanego białka prowadzono w temperaturze pokojowej w 0,01 molowym buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 5,25. Zmianę natężenia prądu notowano przy użyciu galwanostatu/potencjostatu AUTOLAB PGSTAT128N. 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 ABTS jako substratu, linią ciągłą zaznaczony jest pierwszy cykl reakcyjny, linią przerywaną-dwudziestą. Omawiane badania nad aktywnością lakazy były prowadzone przy zastosowaniu ABTS, syringaldazyny jako substratów.

Z przeprowadzonych badań wynika, że obecność kopolimeru zbudowanego z kwasu tiofeno-octowego, 3-metylotiofenu oraz oligomeru poli(3,4-etylenodioksytiofeno-*alt*-9,9-didodecylofluorenu) ze względu na mediacyjny charakter elektroprowadzącego układu, usprawnia transport elektronów, przez co znacznie poprawia aktywność katalityczną unieruchomionego białka.

Długość życia zimmobilizowanego białka według wynalazku wynosi co najmniej 3 miesiące. Stała, wysoka zdolność utleniania substratu zachowana jest przez kolejnych 20 cykli reakcyjnych.

Aktywność białka zimmobilizowanego w filmie stanowi około 90% aktywności użytego do immobilizacji białka natywnego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Elektroda enzymatyczna do wykrywania związków fenolowych, **znamienna tym**, że zawiera białkową warstwę aktywną w postaci lakazy zimmobilizowanej adsorpcyjnie na powierzchni elektrochemicznego filmu, otrzymanego z kopolimeru w skład, którego wchodzi kwas tiofeno-octowy, 3-metylotiofen oraz oligomer poli(3,4-etylenodioksytiofeno-*alt*-9,9-didodecylofluoren).

2. Elektroda według zastrz. 1, **znamienna tym**, że utworzona jest z równomolowej mieszaniny z kwasu tiofeno-octowego, 3-metylotiofenu oraz oligomeru poli(3,4-etylenodioksytiofeno-*alt*-9,9-didodecylofluorenu) oraz lakazy.

Rysunki

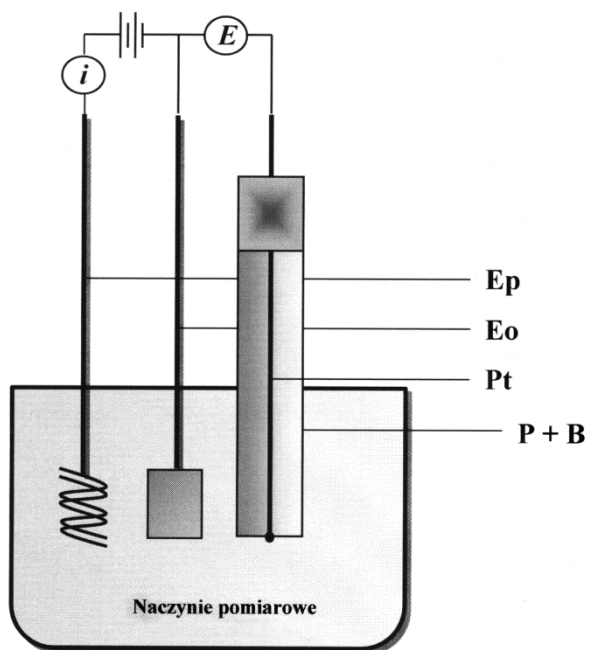


Fig. 1

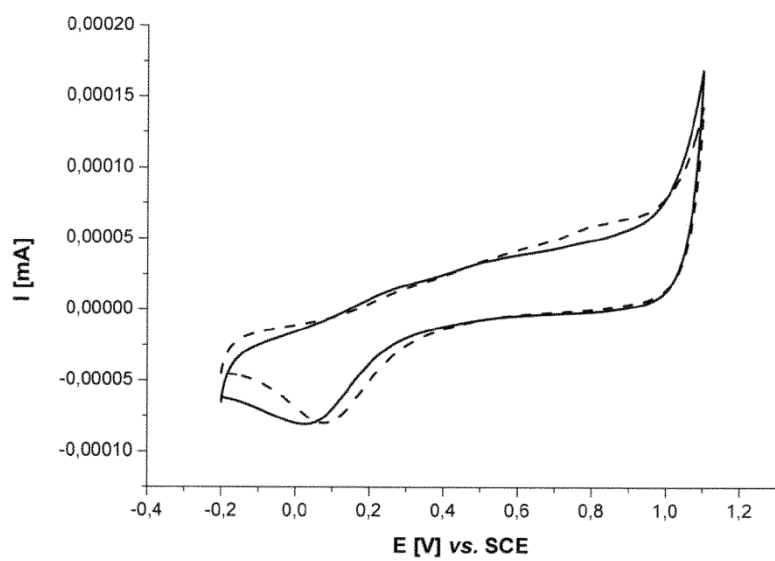


Fig. 2