

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011111257/10, 24.03.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
24.03.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 24.03.2011

(45) Опубликовано: 27.06.2012 Бюл. № 18

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 66815 U1, 27.09.2007. РИХТЕР М. и
др. Избранные методы исследования
крахмала. Пер. с нем. - М.: «Пищевая
промышленность», 1975, с.122-123. US
2010/0304399 A1, 02.12.2010.

Адрес для переписки:

650056, г.Кемерово, б-р Строителей, 47, ГОУ
ВПО Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности, Л.И.
Гориславской

(72) Автор(ы):

Бабич Ольга Олеговна (RU),
Солдатова Любовь Сергеевна (RU),
Просеков Александр Юрьевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное образовательное
учреждение высшего профессионального
образования "Кемеровский технологический
институт пищевой промышленности" (RU)(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БИОСЕНСОРНОГО ЭЛЕКТРОДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОНО-
И ПОЛИСАХАРИДОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и пищевой промышленности, в частности к способу получения аналитического устройства - биосенсорного электрода, который может быть использован для определения содержания моно- и полисахаридов в углеводсодержащем растительном сырье и промежуточных продуктах на разных стадиях технологического процесса. Биосенсорный электрод изготавливают из платины на основе полипиррола с медиатором. В качестве медиатора используют производное пиррола,

содержащее ферроцен. В качестве биорецептора используют фермент, иммобилизованный на магнитных наночастицах Fe_3O_4 с поверхностными карбоксильными группами кросс-сшивкой с карбамидом, причем биосенсорный электрод с биорецептором размещают в корпусе из полупроводникового материала с возможностью подключения к цифроаналоговому преобразователю.

Изобретение позволяет получить компактные устройства с малым временем отклика и высокой чувствительностью определения. 3 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 454 458** (13) **C1**

(51) Int. Cl.

C12M 1/40 (2006.01)

B82B 1/00 (2006.01)

G01N 27/26 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011111257/10, 24.03.2011**

(24) Effective date for property rights:
24.03.2011

Priority:

(22) Date of filing: **24.03.2011**

(45) Date of publication: **27.06.2012 Bull. 18**

Mail address:

**650056, g.Kemerovo, b-r Stroitelej, 47, GOU VPO
Kemerovskij tekhnologicheskij institut pishchevoj
promyshlennosti, L.I. Gorislavskoj**

(72) Inventor(s):

**Babich Ol'ga Olegovna (RU),
Soldatova Ljubov' Sergeevna (RU),
Prosekov Aleksandr Jur'evich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe obrazovatel'noe uchrezhdenie
vysshego professional'nogo obrazovanija
"Kemerovskij tekhnologicheskij institut
pishchevoj promyshlennosti" (RU)**

(54) METHOD OF MAKING BIOSENSOR ELECTRODE FOR DETECTING MONO- AND POLYSACCHARIDES

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: biosensor electrode is made from platinum on a polypyrrole base with a mediator. The mediator used is a pyrrole derivative containing ferrocene. The bioreceptor used is an enzyme which is immobilised on magnetic nanoparticles of Fe₂O₄ with surface carboxyl groups for cross-linking

with carbomide, wherein the biosensor electrode with the bioreceptor is placed in a housing made from semiconductor material with possibility of connection to a digital-to-analogue converter.

EFFECT: invention enables to obtain compact devices with short response time and high detection sensitivity.

3 tbl

RU 2 454 458 C1

RU 2 454 458 C1

Изобретение относится к области биотехнологии и пищевой промышленности, а именно к биосенсорным аналитическим устройствам. Биосенсор может быть использован для определения содержания моно- и полисахаридов в углеводсодержащем растительном сырье и промежуточных продуктах на разных стадиях технологического процесса.

Пищевая промышленность нуждается в экспрессных и широко доступных методах анализа ключевых составных частей или продуктов обмена веществ, определяющих степень качества сырья и продукции. Среди ключевых показателей качества продуктов питания и параметров ряда технологических процессов в пищевой промышленности важное место занимает содержание сахаров, этилового спирта и крахмала.

Наиболее распространенными являются физико-химические методы анализа крахмала. Колориметрический метод основан на свойстве крахмала образовывать ярко-окрашенные комплексы с йодом (М.Рихтер, З.Аугустат, Ф.Ширбаум. Избранные методы исследования крахмала. Пер. с нем. М.: «Пищевая промышленность», 1975. - С.122-123). Однако процесс образования полисахарид-йодных комплексов очень специфичен и сильно зависит от внешних условий - температуры, pH, амилозо-амилопектинового соотношения в крахмале.

При применении поляриметрического метода определения крахмала (метод Эверса) необходимо отделять все оптически активные компоненты, например белки (Авдусь П.Б., Сапожникова А.С. Определение качества зерна, муки и крупы. Изд. 2-ое. М.: Колос, 1967. - С.166-169).

Существуют также биохимические способы определения крахмала. Для этих целей используются каскадные ферментативные реакции гидролиза крахмала и определения субстратов в гидролизате, например, основанные на амилоглюкозидаз-гексокиназ-глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной или α -амилаз-глюкозидаз-пероксидазной трансформации (Beutler H. Methods of enzymatic activity. - 1984. - V.6. - P.2-10). Данные методы используют спектрофотометрическую детекцию конечного продукта. Однако такие анализы дороги и не могут быть широко использованы в технологических процессах.

Описаны различные биосенсорные подходы для детекции олиго- и полисахаридов. Один из способов заключается в проведении внешнего ферментативного гидролиза образца до глюкозы и определении содержания глюкозы глюкозооксидазным сенсором.

Биосенсор - это устройство, состоящее из биологического активного компонента и компонента, преобразующего аналитический эффект в какой-либо регистрируемый сигнал (световой, звуковой). Биохимический преобразователь, или биотрансдюсер, выполняет функцию биологического элемента распознавания, преобразуя определяемый компонент, а точнее информацию о химических связях в физическое или химическое свойство или сигнал, а физический преобразователь это свойство фиксирует с помощью специальной аппаратуры.

В данной области известно большое число технических решений, среди которых наибольшее распространение получили электрохимические биосенсоры - устройства, действие которых основано на ферментативном катализе реакции, в которой освобождаются или поглощаются электроны.

Известен патент, описывающий способ непрерывного определения концентрации глюкозы в образцах (см. пат. США № US 2010304399 (A1), МПК G01N 33/53, опубл. 02.12.2010). Техническое решение заключается в создании биосенсора, состоящего из

биотрансдюсера и полисахарида на его поверхности. В этом случае детектирование глюкозы состоит из следующих стадий: получение раствора карбогидрата и белка, причем соединение карбогидрата и белка имеет, по крайней мере, один рецептор, способный связываться с полисахаридами и глюкозой; контакт смеси с биосенсором;
 5 детектирование количества соединения карбогидрата с белком, связанного с полисахаридом, с помощью биосенсора, в то время как концентрация глюкозы в образце обратно пропорциональна количеству соединения карбогидрата с белком; регенерация поверхности биосенсора высокой концентрацией раствора глюкозы. К
 10 недостаткам предлагаемого технического решения можно отнести нестабильность показаний сенсора во времени и довольно узкий диапазон детекции глюкозы.

Известен также способ стабилизации активности глюкозодегидрогеназы, модифицированной пирроло-хинолин хиноном, в электрохимических биосенсорах на глюкозу (см. пат. США № ZA 200708312 (A), МПК C12Q 1/00 B4, опубл. 26.11.2008).
 15 Авторы патента предлагают использовать глюкозодегидрогеназу, модифицированную пирроло-хинолин хиноном в качестве кофактора фермента в электрохимическом биосенсоре. Предлагаемая композиция включает гидрофильные полимеры, аморфный необработанный кремний, буферный раствор, поверхностно-активные вещества и медиаторы. Основные недостатки предлагаемого способа
 20 связаны с невозможностью хранения получаемых биосенсоров без потери их работоспособности, а также со сложностью и невысокой технологичностью процесса изготовления биосенсора.

Также известен подход к получению биоэлектрода на основе пероксидазы, иммобилизованной на коллоидном золоте (см. пат. Германия № WO 9424262 (A1), МПК C12M 1/40, опубл. 27.10.1994). В предлагаемом способе биоэлектрод получают из пероксидазы хрена, которую сначала адсорбируют на коллоидном золоте, а затем наносят на проводящую поверхность электрода. Затем добавляют фермент-оксидазу
 30 для определения выбранного аналита. Оксидаза, селективная к определенному аналиту, может добавляться к раствору образца в растворимой или иммобилизованной форме. Предлагаемое техническое решение характеризуется таким недостатком, как невозможность получения в ходе анализа достоверных количественных результатов.

Наиболее близким к заявляемому изобретению - прототипом - является изобретение, описывающее устройство для определения олиго- и полисахаридов с использованием иммобилизованных на носителе клеток штамма бактерий *Gluconobacter oxydans* subsp. *industries* B-1280 (см. пат. РФ №66815, МПК G01N 27/26, опубл. 27.09.2007). Предлагаемое устройство состоит из следующих элементов:
 40 электрода Кларка, на котором размещен биорецептор, представляющий собой иммобилизованные на носителе клетки штамма бактерий *Gluconobacter oxydans* subsp. *industries* B-1280, а также измерительной кюветы и магнитной мешалки. Иммобилизацию клеток штамма *Gluconobacter oxydans* subsp. *industries* B-1280
 45 осуществляют физической сорбцией на фильтрах из стекловолокна. Биосенсор чувствителен к наличию олигосахаридов - целлобиозы, мальтозы, мелибиозы - и может быть использован для их определения. Основными недостатками предлагаемого технического решения следует считать трудоемкость получения
 50 результатов, связанную с использованием микроорганизмов и кювет; узкий диапазон детекции определяемых компонентов; относительно большое время отклика сенсора; узкая субстратная специфичность используемого штамма микроорганизмов.

Задачей технического решения является упрощение процедуры выполнения анализа

моно- и полисахаридов, создание портативных биосенсорных устройств, увеличение диапазона детекции компонентов и снижение времени отклика.

Технический результат достигается за счет использования в качестве биорецептора сенсора фермента, иммобилизованного на магнитных наночастицах Fe_3O_4 .

Применение нанообъектов позволяет получить компактные устройства с малым временем отклика и высокой чувствительностью определения.

Сущность изобретения заключается в том, что в качестве основы биосенсора используется платиновый электрод на основе полипиррола с медиатором, в качестве которого выступает производное пиррола, содержащее ферроцен. Роль анионного медиатора в данном случае заключается в обеспечении электронного переноса между ферментом и электродом. На первом этапе полипиррол осаждают на платиновую пластинку площадью 6 см^2 путем полимеризации пиррола при сканировании потенциала электрода между 0 и 0,9 В при скорости развертки потенциала 50 мВ/с. Последующим добавлением производного пиррола, содержащего ферроцен, в полученное покрытие подготавливается электрод Pt/полипиррол - производное пиррола, содержащее ферроцен.

Биорецептор в данном техническом решении представляет собой фермент, иммобилизованный на магнитных наночастицах Fe_3O_4 с поверхностными карбоксильными группами кросс-сшивкой с карбодиимидом. Наночастицы с карбоксильными группами на поверхности получают следующим образом: готовят смесь полиакриловой кислоты, хлорида железа (III) и диэтиленгликоля, нагревают ее при перемешивании в атмосфере азота до 220°C , затем к смеси добавляют раствор гидроксида натрия в диэтиленгликоле, через несколько минут образовавшиеся наночастицы Fe_3O_4 с карбоксильными группами акриловой кислоты отделяют центрифугированием.

Биорецептор (наночастицы Fe_3O_4 размером 100 нм с иммобилизованным ферментом) фиксируют с помощью специальных магнитов на измерительной поверхности платинового электрода, позволяющего измерять концентрацию образующегося пероксида водорода. Данная конструкция заключена в корпус, изготовленный из полупроводникового материала, и связана с цифроаналоговым преобразователем.

Биосенсор работает следующим образом. Датчик погружается в исследуемый раствор. При помещении биосенсора в анализируемый образец происходит химическая реакция между ферментом и анализируемым компонентом. Реакция происходит с участием кислорода O_2 и воды H_2O . Одним из конечных продуктов химической реакции является пероксид водорода H_2O_2 .

При подаче 600 мВ на платиновый электрод перекись водорода распадается на 2 протона водорода, 2 электрона и кислород O_2 . С помощью специального цифроаналогового преобразователя происходит детекция двух образовавшихся электронов (тока). По току можно судить о концентрации компонента в анализируемом растворе, поскольку существует линейная зависимость между образовавшимся током датчика и концентрацией компонента в пробе.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами конкретного выполнения.

Пример 1

В случае биосенсора для определения глюкозы в качестве биохимического трансдьюсера используется фермент глюкозооксидаза, иммобилизованная на наночастицах Fe_3O_4 посредством карбодиимида. Иммобилизацию фермента осуществляют путем выполнения следующей последовательности операций.

Смесь полиметилметакрилата, хлорида железа (III) и диэтиленгликоля нагревают при перемешивании в атмосфере азота до 220°C, после чего к смеси добавляют раствор гидроксида натрия в диэтиленгликоле, через несколько минут образовавшиеся наночастицы Fe_3O_4 со сложноэфирными группами отделяют центрифугированием.

Вторая стадия иммобилизации заключается в формировании на поверхности наночастиц слоя аминопропилтриэтоксисилана за счет протекания реакции аминолита электрофильных фрагментов носителя. В отдельной камере объемом 50 см³ наночастицы (5,0 мг) покрывают газообразным 3-аминопропилтриэтоксисилоном (1 см³) при атмосферном давлении и температуре 70°C в течение 60 мин. После остывания образец обрабатывают этиловым спиртом три раза по 1 см³ и высушивают на воздухе. Далее частицы (5,0 мг) обрабатывают 0,5%-ным раствором 3-аминопропилтриэтоксисилана (растворитель - смесь этанол:вода 1:1) в течение 2 ч при температуре 50°C. На этом этапе происходит совместная поликонденсация силана с триалкоксисилановыми группами. По окончании процесса модификации наночастицы Fe_3O_4 несколько раз промывают растворителем вода - этиловый спирт (1:1) и готовят суспензию наночастиц с концентрацией 5 мг/см³ в фосфатном буфере (pH 5,8).

Далее 200 мкл суспензии инкубируют с 200 мкл 100 мМ 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)-карбодиимида-м-п-толуолсульфоната в фосфатном буфере в течение 2 ч при непрерывном перемешивании при комнатной температуре. По окончании инкубации суспензию промывают три раза фосфатным буфером и готовят суспензию в 500 мкл фосфатного буфера.

На следующей стадии растворяют 500 мкг глюкозооксидазы в 500 мкл фосфатного буфера (pH 5,8) и инкубируют полученный раствор с 500 мкл суспензии наночастиц в фосфатном буфере (pH 5,8) при температуре 30°C в течение 2 ч. По окончании иммобилизации наночастицы промывают фосфатным буферным раствором до исчезновения активности в промывных водах.

Полученный биорецептор высушивают и фиксируют с помощью специальных магнитов на измерительной поверхности платинового электрода, позволяющего измерять концентрацию образующегося пероксида водорода. Данная конструкция заключена в корпус, изготовленный из полупроводникового материала, и связана с цифроаналоговым преобразователем. Физико-химические характеристики биосенсора для определения глюкозы представлены в табл.1.

Физико-химические параметры биосенсора для определения глюкозы

Таблица 1

Способ детекции	Диапазон детекции, мМ	Время анализа, мин	Воспроизводимость сигнала, %	Стабильность при хранении, мес.
Предлагаемое техническое решение	0,01-10,0	3-5	2,0	6
Прототип	0,05-5,0	10-15	5,0	4

Пример 2

Ферментом, используемым при конструировании биосенсора на крахмал, является амилоSUBТИЛИН ГЗх, иммобилизованный на частицах Fe_3O_4 . Иммобилизация осуществляется следующим образом. Получение наночастиц Fe_3O_4 с поверхностными сложноэфирными группами и их модификацию силаном осуществляют аналогично примеру 1. По окончании процесса модификации наночастицы Fe_3O_4 несколько раз

промывают растворителем вода-этиловый спирт (1:1) и готовят суспензию наночастиц с концентрацией 5 мг/см³ в фосфатном буфере (pH 6,5).

Далее 200 мкл суспензии инкубируют с 200 мкл 100 мМ 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)-карбодиимида-м-п-толуолсульфоната в фосфатном буфере в течение 2 ч при непрерывном перемешивании при комнатной температуре. По окончании инкубации суспензию промывают три раза фосфатным буфером и готовят суспензию в 500 мкл фосфатного буфера.

На следующей стадии растворяют 500 мкг амилосубтилина ГЗх в 500 мкл фосфатного буфера (pH 6,5) и инкубируют полученный раствор с 500 мкл суспензии наночастиц в фосфатном буфере (pH 6,5) при температуре 30°C в течение 2 ч. По окончании иммобилизации наночастицы промывают фосфатным буферным раствором до исчезновения активности в промывных водах.

Дальнейшие действия по получению биосенсора для определения крахмала аналогичны примеру 1. Физико-химические характеристики биосенсора для определения крахмала представлены в табл.2.

Физико-химические параметры биосенсора для определения крахмала				
Способ детекции	Диапазон детекции, %	Время анализа, мин	Воспроизводимость сигнала, %	Стабильность при хранении, мес.
Предлагаемое техническое решение	0,001-0,5	2-3	2,0	6
Прототип	0,003-0,05	10-15	5,0	4

Пример 3

Роль биохимического трансдюсера в биосенсоре на целлобиозу играет фермент целлобиаза, иммобилизованная на наночастицах Fe₃O₄. Иммобилизация фермента включает следующие операции. Получение наночастиц Fe₃O₄ с поверхностными сложноэфирными группами и их модификацию силаном осуществляют аналогично примеру 1. По окончании процесса модификации наночастицы Fe₃O₄ несколько раз промывают растворителем вода-этиловый спирт (1:1) и готовят суспензию наночастиц с концентрацией 5 мг/см³ в фосфатном буфере (pH 5,5).

Далее 200 мкл суспензии инкубируют с 200 мкл 100 мМ 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)-карбодиимида-м-п-толуолсульфоната в фосфатном буфере в течение 2 ч при непрерывном перемешивании при комнатной температуре. По окончании инкубации суспензию промывают три раза фосфатным буфером и готовят суспензию в 500 мкл фосфатного буфера.

На следующей стадии растворяют 500 мкг целлобиазы в 500 мкл фосфатного буфера (pH 5,5) и инкубируют полученный раствор с 500 мкл суспензии наночастиц в фосфатном буфере (pH 5,5) при температуре 30°C в течение 2 ч. По окончании иммобилизации наночастицы промывают фосфатным буферным раствором до исчезновения активности в промывных водах.

Дальнейшие действия по получению биосенсора для определения целлобиозы аналогичны примеру 1. Физико-химические характеристики биосенсора для определения целлобиозы представлены в табл.3.

Физико-химические параметры биосенсора для определения целлобиозы				
Способ детекции	Диапазон детекции, мМ	Время анализа, мин	Воспроизводимость сигнала, %	Стабильность при хранении, мес.

Предлагаемое техническое решение	0,01-10,0	3-5	2,0	6
Прототип	0,05-5,0	10-15	5,0	4

Таким образом, предлагаемый биосенсор на основе наночастиц Fe_3O_4 обеспечивает быстрое определение содержания глюкозы, крахмала и целлобиозы с использованием компактного электрохимического устройства. Можно выделить следующие преимущества данного изобретения перед прототипом:

- увеличение диапазона детекции компонентов;
- уменьшение продолжительности анализа;
- повышение стабильности при хранении.

Формула изобретения

Способ получения биосенсорного электрода для определения моно- и полисахаридов, включающий использование электрода, нанесение на поверхность его биорецептора, отличающийся тем, что биосенсорный электрод выполняют из платины на основе полипиррола с медиатором, в качестве которого выступает производное пиррола, содержащее ферроцен, в качестве биорецептора используют фермент, иммобилизованный на магнитных наночастицах Fe_3O_4 с поверхностными карбоксильными группами кросс-сшивкой с карбомидом, при этом биосенсорный электрод с расположенным на нем биорецептором размещают в корпусе, изготовленном из полупроводникового материала, с возможностью подключения к цифроаналоговому преобразователю.