



(12) Wirtschaftspatent

Korrigiert gemäß § 23 Absatz 2 Anordnung
über die Verfahren vor dem Patentamt

(19) **DD** (11) **255 954 C2**

4(51) C 12 Q 1/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21)	WP C 12 Q / 296 930 2	(22)	02.12.86	(44)	01.03.89
				(44)	20.04.88

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22/23, Berlin, 1080, DD
(72)	Kühn, Manfred, Dr. rer. nat. Dipl.-Chem., DD; Benes, Milan, Dr., CS

(54) **Stabile Biosensoren und Verfahren zu ihrer Herstellung**

(57) Stabile Biosensoren bestehen aus SH-Enzyme enthaltendem biokatalytisch aktivem Material und vor Schwermetallinaktivierung schützendem Membranmaterial. Bevorzugte schwermetallbindende Membranbestandteile sind Komplexliganden, Heteroaromaten mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom und funktionelle Gruppen, die mit Schwermetallen schwer dissoziierbare Verbindungen ergeben. Die Arbeits- und Lagerstabilität der erfindungsgemäßen Biosensoren ist von wenigen Tagen auf mehrere Wochen ausgedehnt.

Patentansprüche:

1. Stabile Biosensoren auf der Basis elektrochemischer Grundsensoren mit einer biokatalytisch aktiven Schicht, **dadurch gekennzeichnet**, daß die biokatalytisch aktive Schicht aus einem biokatalytisch aktiven Material und einem in wäßrigen Lösungen unlöslichen Membranmaterial mit schwermetallbindenden Eigenschaften besteht.
2. Stabile Biosensoren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als biokatalytisch aktives Material ein oder mehrere SH-Enzyme in isolierter Form oder diese als Bestandteil höher integrierter biologisch aktiver Systeme eingesetzt werden.
3. Stabile Biosensoren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Membranmaterial mit schwermetallbindenden Eigenschaften in Wasser unlösliche organische und/oder anorganische Trägermaterialien mit kovalent gebundenen Komplexbildnern oder Heteroaromaten mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom oder funktionelle und mit Schwermetallen schwer dissoziierbare Verbindungen ergebende Gruppen eingesetzt werden.
4. Verfahren zur Herstellung von stabilen Biosensoren, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein elektrochemischer Grundsensoren mit einer Schicht eines biokatalytisch aktiven Materials mit einem schwermetallbindenden und in Wasser unlöslichen Membranmaterial in Kontakt gebracht wird.
5. Verfahren zur Herstellung von stabilen Biosensoren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein elektrochemischer Grundsensoren mit dem an seiner aktiven Oberfläche haftenden SH-Enzym oder SH-Enzymgemisch oder solche SH-Enzyme enthaltendem höher integriertem System in eine Lösung eines organischen Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches mit dem darin aufgelösten schwermetallbindenden Membranmaterial eingetaucht und das Lösungsmittel verdampft wird.
6. Verfahren zur Herstellung von stabilen Biosensoren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein elektrochemischer Grundsensoren in eine Suspension aus einem organischen Lösungsmittel, einem in diesem organischen Lösungsmittel löslichen und einem darin unlöslichen Trägermaterial mit schwermetallbindenden Eigenschaften und einem SH-Enzym oder SH-Enzymgemisch oder solche SH-Enzyme enthaltendem höher integriertem System eingetaucht und danach das organische Lösungsmittel verdampft wird.
7. Verfahren zur Herstellung von stabilen Biosensoren nach Anspruch 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß die biokatalytisch aktive Schicht durch Eintauchen des zunächst mit einem SH-Enzym oder SH-Enzymgemisch oder solche SH-Enzyme enthaltenden höher integrierten System und dem schwermetallbindenden Membranmaterial beladenen elektrochemischen Grundsensoren in eine wäßrige Lösung gebildet wird.

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft stabile Biosensoren, die aus einer biokatalytisch aktiven Schicht mit einem SH-Enzym und einem elektrochemischen Transducer bestehen und Verfahren zu ihrer Herstellung. Anwendungsgebiete sind die Medizin, Biotechnologie, Land- und Nahrungsgüterwirtschaft und der Umweltschutz.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zur Entwicklung von zu den Biosensoren gehörenden biospezifischen Elektroden, die aus amperometrischen, potentiometrischen oder konduktometrischen Elektroden bzw. ionenselektiven Feldeffekttransistoren, den sogenannten elektrochemischen Transducern und in Membranen immobilisierten Enzymen, den sogenannten biokatalytisch aktiven Membranen, hergestellt werden, können eine Reihe von SH-Enzymen verwendet werden, z. B. Urease, Asparaginase, α -Glucosidase, Alkoholdehydrogenase und andere. Viele dieser biospezifischen Elektroden stehen vor der Einführung in die Praxis (F. W. Scheller et al., Biosensors 1 [1985] 135–160), obwohl noch eine Reihe ungelöster Probleme deren breiter Anwendung im Wege stehen. Eine Ursache besteht in der teilweise geringen Arbeits- und Lagerstabilität von solchen biospezifischen Elektroden, in deren biokatalytisch aktiver Membran SH-Enzyme immobilisiert sind, das heißt solche Enzyme, die zur Herausbildung der biokatalytischen Aktivität freie Sulfhydrylgruppen — im weiteren als SH-Gruppen bezeichnet — benötigen. Diese SH-Enzyme reagieren ausgesprochen empfindlich gegenüber geringsten Spuren von Schwermetallen, durch die sie inaktiviert werden. Bei analytischen Verfahren unter Verwendung von biospezifischen Elektroden läßt sich aber die Anwesenheit von Schwermetallionen in den Meßlösungen selten vermeiden. Zum einen werden die Meßlösungen aus Chemikalien hergestellt, die in der Regel trotz höchster Reinheitsgrade noch Spuren von Schwermetallen enthalten, die aber ausreichend sind, um bei kontinuierlichem Einwirken auf SH-Enzyme infolge längerer Einsatzes der biospezifischen Elektroden diese zu inaktivieren. Zum anderen diffundieren aus den zur Herstellung der biospezifischen Elektroden verwendeten Elektroden, z. B. aus den Bezugselektroden, laufend Schwermetallionen in die die biospezifischen Elektroden umgebenden Meßlösungen, mit dem Ergebnis, daß die in den biokatalytisch aktiven Membranen befindlichen SH-Enzyme inaktiviert werden.

Aus diesen Darlegungen wird weiter ersichtlich, daß nicht nur isolierte SH-Enzyme durch Schwermetalle inaktiviert werden. Bekannt ist, daß höher integrierte biokatalytisch aktive Systeme wie Mikroorganismen oder Zellen pflanzlichen bzw. tierischen Ursprungs SH-Enzyme enthalten und solche Systeme auf Grund ihrer biokatalytischen Aktivität auch zur Herstellung von mikrobiellen Elektroden zur Substratanalytik herangezogen werden. Aber auch hier treten die genannten Probleme der geringen Arbeits- und Lagerstabilität infolge Inaktivierung durch Schwermetalle auf. Aus den geschilderten Problemen resultieren somit eingeschränkte Einsatzmöglichkeiten von biospezifischen Elektroden und mikrobiellen Elektroden. Zum Schutz von SH-Enzymen vor Schwermetallinaktivierung, auch in biospezifischen Elektroden und mikrobiellen Elektroden, sind in der Vergangenheit eine Reihe von Methoden bekannt geworden (DE-Offenlegungsschrift mit der Nummer 3347 104 und DD-WP C 12 Q/269 576 0). Die Lösungen in diesen Patentschriften und darin aufgeführter weiterer Literatur bestehen darin, daß zum Schutz der SH-Enzyme vor ein- oder mehrwertigen Schwermetallionen den Meßlösungen lösliche Sulfhydrylverbindungen allein oder Sulfhydrylverbindungen in Kombination mit Chelatbildnern, Reduktionsmitteln und Enzymstabilisatoren zugesetzt werden. Dieses Vorgehen hat allerdings einschneidende Nachteile, denn neben hochreinen und damit teuren Chemikalien und Biochemikalien werden dabei toxische und unangenehm riechende Chemikalien eingesetzt, so daß eine allgemeine Routineanwendung dieser Verfahren nicht empfohlen werden kann.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, stabile Biosensoren und Verfahren zu ihrer Herstellung zu entwickeln, die die geschilderten Nachteile nicht besitzen und dadurch eine breitere Anwendung von biospezifischen Elektroden und mikrobiellen Elektroden ermöglichen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, länger einsetzbare Biosensoren durch Stabilisierung von biokatalytisch aktiven Schichten bereitzustellen. Die erfindungsgemäßen Biosensoren bestehen aus einem elektrochemischen Grundsensoren mit einer biokatalytisch aktiven Schicht, die sich aus einem biokatalytisch aktiven Material und einem in wäßrigen Systemen unlöslichen Membranmaterial mit schwermetallbindenden Eigenschaften zusammensetzt. Als biokatalytisch aktives Material werden ein oder mehrere SH-Enzyme wie z. B. Urease, Asparaginase, α -Glucosidase, Alkoholdehydrogenase oder ein ein bzw. mehrere SH-Enzyme enthaltendes höher integriertes biologisch aktives System wie z. B. Mikroorganismen und Zellen oder Organellen von Pflanzen und Tieren eingesetzt.

Das schwermetallbindende Membranmaterial ist im allgemeinen in organischen Lösungsmitteln löslich. In einigen Fällen kann es darin aber auch als anorganisches oder organisches Material in suspensierter Form vorliegen. In jedem Falle aber sind die membranbildenden Materialien mit schwermetallbindenden Eigenschaften in wäßrigen Lösungen unlöslich. Die schwermetallbindenden Membranmaterialien enthalten — kovalent gebunden — komplexbildende Liganden oder andere funktionelle Gruppen, die mit Schwermetallen schwer dissoziierbare Verbindungen ergeben. In Frage kommen dabei solche schwermetallbindenden Materialien, die zur Bindung ein- oder mehrwertiger Schwermetalle Strukturen mit kovalent gebundenen Chelatbildnern vom Typ der Iminoessigsäure und des 8-Hydroxychinolins oder Heteroaromaten mit endocyclischem, tertiärem Stickstoffatom, vorzugsweise Imidazol, besitzen. Aber auch SH-Gruppen enthaltende Trägermaterialien, die besonders schwer dissoziierbare Schwermetallmercaptide bilden, eignen sich als schwermetallbindende Membranmaterialien zum Schutz der schwermetallempfindlichen SH-Enzyme in den Membranen der Biosensoren. Wegen ihrer Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln werden vorteilhaft unvernetztes und mit den genannten Gruppen funktionalisiertes Celluloseacetat oder Polyvinylchlorid oder ähnliche Polymere als membranbildende organische Träger verwendet. Aber auch Suspensionen, hergestellt aus in organischen Lösungsmitteln löslichem, unvernetztem und unmodifiziertem Celluloseacetat oder Polyvinylchlorid und in den gleichen organischen Lösungsmitteln unlöslichen und feinpulverisierten Trägermaterialien organischen oder anorganischen Ursprungs mit kovalent gebundenen Chelatbildnern oder funktionellen Gruppen mit schwermetallbindenden Eigenschaften, können zur Membranherstellung eingesetzt werden.

Die Biosensoren werden hergestellt, indem ein amperometrischer, potentiometrischer, konduktometrischer Grundsensoren oder ein ionenselektiver Feldeffekttransistor mit den an ihrer sensitiven Oberfläche haftenden SH-Enzymen oder SH-Enzymgemischen oder solche SH-Enzyme enthaltenden höher

integrierten Systemen in eine Lösung eines organischen Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches mit dem darin aufgelösten schwermetallbindenden Membranmaterial bzw. daß der Grundsensoren in eine Suspension aus einem organischen Lösungsmittel, einem in diesem organischen Lösungsmittel löslichen und einem darin unlöslichen Trägermaterial mit schwermetallbindenden Eigenschaften und einem SH-Enzym oder SH-Enzymgemisch oder solche SH-Enzyme enthaltenden höher integrierten System eingetaucht wird. Durch Verdampfen des organischen Lösungsmittels bei möglichst niedriger Temperatur oder durch Eintauchen des Sensors in eine wäßrige Lösung wird eine die SH-Enzyme oder solche SH-Enzyme oder enthaltende höher integrierte biologische Systeme einschließende und vor Schwermetallinaktivierung schützende schwermetallbindende Membran gebildet. Andere Technologien zur Membrangewinnung mit den

erfindungsgemäßen schwermetallbindenden Membranmaterialien sind ebenfalls geeignet, SH-Enzyme in Biosensoren vor Schwermetallinaktivierung zu schützen. In Modifikation der schon beschriebenen Vorgehensweise kann z. B. die biokatalytisch aktive Membran auf der Sensoroberfläche auch so hergestellt werden, daß der Grundsensoren mit freier, sensitiver Oberfläche erst in eine Suspension eingetaucht wird, die aus einem leicht flüchtigen, organischen Lösungsmittel, einem der beschriebenen Trägermaterialien mit schwermetallbindenden Eigenschaften und einem SH-Enzym gewonnen wird und danach das organische Lösungsmittel verdampft wird.

Die auf die beschriebene Art entwickelten Biosensoren vom Typ amperometrischer, potenziometrischer oder konduktometrischer biospezifischer Elektroden bzw. Enzymfeldeffekttransistoren mit SH-Enzymen als Biokatalysator zeichnen sich durch eine bemerkenswert hohe Arbeits- und Lagerstabilität aus. Die Arbeitsstabilität z. B. konnte so von 3–4 Tagen auf mindestens 2–3 Wochen ausgedehnt werden. Die Einsatzdauer eines solchen stabilisierten Biosensors ist selbstverständlich von der Schwermetallbelastung des Meßmediums abhängig, weil ja die Kapazität der Membran für Schwermetalle nicht unbegrenzt ist. Unter den gewöhnlichen Bedingungen der quantitativen Analyse von Substraten mit Biosensoren werden aber unter allen Umständen für die nach der Erfindung stabilisierten Biosensoren Einsatz- und Standzeiten von zwei Wochen erreicht.

Das bedeutet einen wesentlichen Fortschritt zum Stand der Technik und erlaubt einen längeren, breiteren und damit effektiveren Einsatz von Biosensoren, die mit SH-Enzymen in der biokatalytisch aktiven Schicht hergestellt werden. Der Gegenstand der Erfindung wird an Hand von Beispielen weiter erläutert, die aber den Umfang nicht einschränken sollen.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

50 mg mit SH-Gruppen modifiziertes Celluloseacetat (SH-Gruppengehalt $22 \mu\text{Mol/g}$ Träger) werden unter Rühren bei Raumtemperatur in 2,5 ml frisch destilliertem Dimethylformamid gelöst. Gleichzeitig wird auf der pH-sensitiven Oberfläche einer auf üblichem Wege in den meßbereiten Zustand gebrachten pH-Einstabmeßkette Urease adsorptiv gebunden. Die so vorbehandelte pH-Elektrode wird etwa 5 Sekunden in die Polymerenlösung eingetaucht und zur Biosensorentwicklung auf zwei Wegen weiterbehandelt. Im ersten Fall wird die pH-Elektrode in Aceton getaucht und das Lösungsmittel bei Raumtemperatur verdampft. Im zweiten Fall wird die pH-Elektrode unmittelbar nach dem Eintauchen in die Polymerenlösung in eine wäßrige Lösung getaucht. In beiden Fällen wird eine Membran gebildet, die die Urease einschließt und auf der pH-sensitiven Oberfläche der pH-Elektrode fest fixiert. Eine solche potentiometrische Enzymelektrode kann mindestens 3 Wochen zur Harnstoffbestimmung in physiologischen Lösungen benutzt werden. Zum Beispiel besitzt sie nach 10 Tagen noch mehr als 50% der Ausgangsaktivität, während eine gleiche, aber mit gewöhnlichem, unmodifiziertem Celluloseacetat hergestellte Enzymelektrode schon nach 3–4 Tagen keine Aktivität mehr besitzt, die immobilisierte Urease also vollständig inaktiviert wurde.

Beispiel 2

Urease, Polyvinylchlorid und nach dem DDR-WP 124 405 hergestelltes imidazolhaltiges, pulverisiertes Polymeres (Imidazolgehalt 1,46 mM/g Träger) in gleichen Gewichtsverhältnissen (1:1:1) werden in von Peroxiden befreitem frisch destilliertem Tetrahydrofuran gelöst bzw. suspendiert. In die gerührte Suspension wird eine meßbereite pH-Einstabmeßkette eingetaucht, und das organische Lösungsmittel wird danach bei Raumtemperatur verdampft. Die gebildete biologisch aktive Membran besitzt eine hohe Ureasestabilität, die bei täglichem 3stündigem Einsatz nach einer Woche noch unverändert ist. Nach zweiwöchigem Einsatz unter gleichen Bedingungen besitzt diese Enzymelektrode noch 60% der ursprünglichen Aktivität. Eine gleiche Enzymelektrode, aber ohne schwermetallbindende Polymerenkomponente, ist schon nach 3 Tagen vollständig inaktiviert.