



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

254645

(11) (B1)

(51) Int. Cl.⁴

C 12 N 11/04

(22) Přihlášeno 26 06 86

(21) PV 4738-86.X

(40) Zveřejněno 14 05 87

(45) Vydáno 15 09 88

(75)

Autor vynálezu

MAREK MIROSLAV doc. ing. CSc., VRBOVÁ EVA, PRAHA, NEPOŽITEK JIŘÍ ing.,
PROSTĚJOV, DOLEŽAL BOHUSLAV doc. ing. CSc., VOLF RADKO ing. CSc.,
ŠŤASTNÝ MILOSLAV ing. CSc., PRAHA

(54) Způsob přípravy enzymové, resp. hybridní elektrody

Řešení se týká přípravy enzymové, resp. hybridní elektrody, jejíž podstata spočívá v tom, že se enzym nebo směs enzymů a/nebo celých buněk nebo jejich fragmentů, imobilisuje do kolagenové hmoty rozmícháním v této hmotě s následným prokřížením pomocí bifunkčních činidel a vytvořený kolagenový gel se fixuje na povrch elektrochemického sensoru například přetažením a upevněním membrány propustné pro nízkomolekulární sloučeniny.

Vynález se týká způsobu přípravy enzymové, resp. hybridní elektrody.

Použití enzymů i celých biochemických systémů v analytické chemii znamená výrazný pokrok především z hlediska vysoké substrátové a účinkové specifity enzymů a tím i probíhajících reakcí, čímž je dána i vysoká selektivnost prováděných analýz. Reakce katalysované enzymy probíhají při velmi nízkých koncentracích substrátu s vysokou reakční rychlostí, aniž by vyžadovaly extrémní hodnoty teploty, tlaku pH reakční směsi. Z těchto důvodů je snížena na minimum možnost ovlivnění výsledku analýz tvorbou vedlejších produktů reakce, případně reakcemi jiných složek analyzované směsi látek.

Použití volných enzymů naráží v některých případech na technické či ekonomické problémy jejich získávání, obtížnou regeneraci z reakční směsi, poměrně malou stabilitu volných enzymů atd. Tyto problémy jsou postupně řešeny náhradou rozpustných enzymů imobilizovanými enzymy použitelnými pro velký počet analýz.

Výrazné uplatnění našly imobilizované enzymy ve formě enzymových elektrod. Enzymové elektrody jsou realizovány spojením imobilizovaného enzymu a vhodného elektrochemického senzoru. Tímto způsobem je možno detegovat průběh všech enzymových reakcí, při kterých dochází ke změně koncentrace elektrochemicky detegovatelných látek. Velkou výhodou enzymových elektrod je rychlost, přesnost a reprodukovatelnost stanovení a dále možnost analýzy roztoků barevných, kapalných či fluoreskujících, kde jsou jiné způsoby detekce obtížné. Tato skutečnost umožňuje jejich použití v nejrůznějších oblastech chemie, chemické technologie, farmaceutického a potravinářského průmyslu, v moderních biotechnologiích a v klinické biochemii.

Analýtická využitelnost enzymových elektrod je podstatně ovlivněna jejich stabilitou. K hlavním faktorům, které ovlivňují stabilitu enzymových elektrod, patří způsob imobilisace, množství navázaného enzymu, čistota enzymu, podmínky enzymové reakce a stabilita senzoru /elektrochemického čidla/. Z uvedených faktorů je způsob imobilisace nejnáze ovlivnitelným faktorem, kterému je věnována náležitá pozornost.

Vzhledem k tomu, že izolace některých enzymů je technicky či ekonomicky velmi náročná a dále s přihlednutím ke skutečnosti, že některé izolované enzymy jsou málo stabilní i v imobilizované formě, byla vyvinuta technika přípravy buněčných a hybridních elektrod.

Tyto elektrody jsou připravovány za obdobných podmínek jako enzymové elektrody s tím rozdílem, že místo enzymu jsou na povrchu elektrochemického senzoru zachyceny celé buňky, případně buňky společně s přidávanými enzymy. Pro analytické účely se pak využívá analyticky významných enzymů, které jsou u použitých buněk v nadprodukci /a které jsou díky fyziologickému prostředí, v němž se nalézají, podstatně stabilnější než v izolovaném stavu/ nebo se analyticky využívá spřažených enzymových reakcí či celých komplexů metabolických pochodů, nejčastěji buněčné respirace.

K přípravě buněčných nebo hybridních elektrod se běžně používají buňky mikrobiální, především kvasničné a bakteriální. Mohou být však použity i izolované buňky živočišné či rostlinné nebo různé subcelulární částice, jako např. mitochondrie.

Z jednotlivých imobilizačních postupů se pro přípravu buněčných či hybridních elektrod nejčastěji používá zabudování do gelu ať již přírodního /želatina, agar, algináty/ či syntetického /polyakrylamid/.

Způsobem podle vynálezu je enzymová, resp. hybridní elektroda připravena imobilizací enzymů, buněk či jejich fragmentů, případně jejich směsí do kolagenového gelu. Biologický, enzymově aktivní materiál se suspenduje v kolagenové hmotě, načež se vytvořená hustá suspenze prokřídí a zpevní pomocí bifunkčních činidel (např. glutaraldehydu). Vytvořený gel se poté fixuje na povrch elektrochemického senzoru a s výhodou se od reakčního prostoru oddělí membránou propustnou pro nízkomolekulární látky /např. celofánovou membránou/.

Výhodou způsobu přípravy enzymové, resp. hybridní elektrody podle vynálezu je především jednoduchost způsobu imobilizace biologicky aktivního materiálu do kolagenové hmoty, kdy není nutná její předchozí aktivace a kdy je možno přímo imobilisovat jak samotné enzymy, tak i celé buňky či jejich fragmenty. Vytvořená tenká vrstva kolagenu, ve kterém je imobilisován enzymově aktivní materiál jednak vlastním zabudováním do vytvořené struktury kolagenového gelu a jednak následným prokřížením pomocí bifunkčních činidel, vytváří pro tento imobilisovaný materiál velmi příznivé podmínky z hlediska jeho stability. Enzymové, resp. hybridní elektrody připravené způsobem podle vynálezu jsou proto velmi stabilní.

Vynález je dokumentován příklady použití, aniž by se jimi omezoval:

P ř í k l a d 1

Kolagenová hmota /1 g/ byla rozmíchána ve 2 ml $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátového pufru pH 5,8. Po krátkém zahřátí /2 min/ na 40°C , kdy došlo ke ztekucení, bylo aplikováno na celofánovou membránu o síle $30 \mu\text{m}$ $20 \mu\text{l}$ této hmoty, $0,2 \text{ mg}$ lyofilizovaného preparátu glukosaoxidázy a $2 \mu\text{l}$ neředěného preparátu katalazy. Po promíchání vytvořené směsi bylo přidáno $5 \mu\text{l}$ 5% vodného roztoku glutaraldehydu a směs byla opět promíchána. Celofánová membrána s gelem byla přiložena na kyslíkové čidlo Clarkova typu a pevně zafixována. Vytvořený kolagenový gel s imobilisovanými enzymy byl zachycen pod touto membránou, čímž byl zároveň chráněn před mechanickým poškozením. Celá elektroda byla uchovávána v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátovém pufru pH 5,8 při 4°C . Časový interval mezi přípravou enzymové elektrody a prvním stanovením její odezvy, resp. vlastním stanovením D-glukosy byl 24 hodin.

P ř í k l a d 2

Ke ztekucené kolagenové hmotě připravené podle příkladu 1 a nanesené na celofánovou membránu bylo přidáno 5 mg buněčných stěn kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* s invertasovou aktivitou, $0,2 \text{ mg}$ lyofilizovaného preparátu glukosaoxidasy a $2 \mu\text{l}$ neředěného preparátu katalasy a mutarotasy. Po promíchání vytvořené směsi bylo přidáno $5 \mu\text{l}$ 5% vodného roztoku glutaraldehydu a směs byla opět promíchána. Celofánová membrána s gelem byla přiložena kolagenovou stranou na kyslíkové čidlo Clarkova typu a pevně zafixována. Celá elektroda byla uchovávána v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátovém pufru pH 5,8 při 4°C . Časový interval mezi přípravou enzymové elektrody a vlastním stanovením sacharosy byl 24 hodin.

P ř í k l a d 3

Ke ztekucené kolagenové hmotě připravené podle příkladu 1 a nanesené na celofánovou membránu bylo přidáno 10 mg vlhkých kvasinek *Saccharomyces uvarum* kultivovaných v mediu obsahujícím etanol. Po promíchání vytvořené směsi bylo přidáno $5 \mu\text{l}$ 5% vodného roztoku glutaraldehydu a směs byla opět promíchána. Celofánová membrána s gelem obsahujícím imobilisované buňky byla přiložena na kyslíkové čidlo Clarkova typu a pevně zafixována. Celá elektroda byla uchovávána v $0,1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ fosfátovém pufru pH 5,8 při 4°C . Časový interval mezi přípravou kvasničné elektrody a vlastním stanovením etanolu byl 24 hodin.

P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob přípravy enzymové, resp. hybridní elektrody vyznačující se tím, že se enzym či směs enzymů a/nebo celých buněk nebo jejich fragmentů imobilisuje do kolagenové hmoty jejich rozmícháním v této hmotě s následným prokřížením pomocí bifunkčních činidel, s výhodou pomocí glutaraldehydu, a vytvořený kolagenový gel s imobilisovaným enzymově aktivním biologickým materiálem se fixuje na povrch elektrochemického senzoru.

2. Způsob podle bodu 1 vyznačující se tím, že se fixace kolagenového gelu s imobilizovaným enzymově aktivním biologickým materiálem provede přetažením a upevněním membrány propustné pro nízkomolekulární sloučeniny.