

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

УДК 53.082.9.

DOI 10.26456/vtchem2021.4.1

СОВРЕМЕННЫЕ РЕШЕНИЯ ПО ОПТИМИЗАЦИИ ФЕРМЕНТНЫХ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ

Г.А. Туманов, Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, М.Г. Сульман

Тверской государственный технический университет, г. Тверь

На сегодняшний день оптимизации биосенсоров путем различных методов нанесений или подбора эффективных систем окислительно-восстановительных ферментов посвящено множество исследований. В статье приведен обзор способов получения биосенсоров, включающих такие системы ферментов как лактатдегидрогеназа/пируватоксидаза, лактатоксидаза/пероксидаза/глюкозооксидаза, глюконаткиназа/креатинкиназа и саркозиноксидаза/пероксидаза, пероксидаза/глюкозооксидаза, глюкозооксидаза/ β -галактозидаза. Проанализировано влияние принципов иммобилизации и количества ферментов на эффективность получаемых систем. Мультиферментные биосенсоры, содержащие два или более ферментов, демонстрировали многообещающие стабильность и селективность, что свидетельствует о перспективности исследований в данном направлении.

Ключевые слова: биосенсор, окислительно-восстановительные ферменты, электрохимический сигнал, иммобилизация фермента.

В последние десятилетия биосенсинг зарекомендовал себя как инновационный аналитический метод сразу в нескольких научных областях: как в области окружающей среды, так и во многих биомедицинских приложениях. Биосенсор представляет собой устройство безреагентного анализа соединений. Данный прибор состоит из биологически чувствительного элемента, физического преобразователя и рабочего раствора. Современные биосенсоры можно уменьшить в размерах, производить массово и легко транспортировать. Биосенсоры также могут измерять аналиты в режиме реального времени, что чрезвычайно полезно для мониторинга быстрых изменений в биологических жидкостях [1].

В состав биосенсоров могут входить один или несколько ферментов. Основной принцип работы мультиферментных электрохимических биосенсоров базируется на каскадных мультиферментных реакциях, содержащих пары редокс- и нередокс-ферментов, способных превращать анализируемые вещества в определенную форму, которая может быть окислена следующей реакцией редокс-фермента. В качестве нередокс-фермента для реакции

превращения анализируемого соединения могут использоваться любые возможные ферменты, такие как киназы, трансферазы, инвертазы и гидролазы. Каскадные ферментативные реакции этих «редокс–нередокс» ферментных пар приводят к образованию перекиси водорода в качестве электроактивного продукта, способного генерировать электрохимические сигналы (Рис. 1).

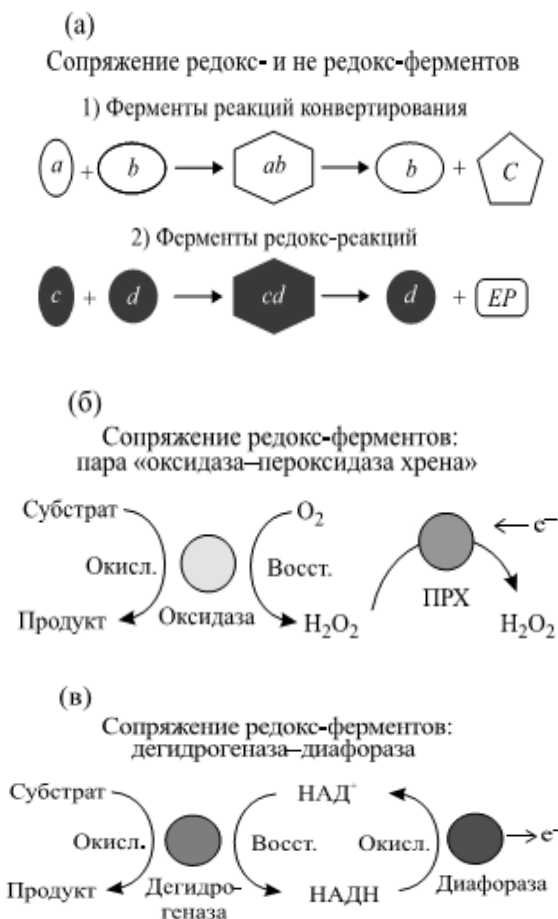


Рис. 1. Типы каскадных мультиферментных реакций: (а) – каскадная реакция не редокс-восстановительной и редокс-восстановительной ферментных пар; (б) – каскадная реакция ферментной пары «оксидаза–пероксидаза хрена»; (в) – каскадная реакция ферментной пары «дегидрогеназа–диафораза». Обозначения: а – субстрат (аналит), b – ферменты конверсии, с – промежуточный реагент, d – редокс-ферменты, EP – электроактивный продукт

Первая искусственная биферментная система, включающая ковалентно связанные с полимерным носителем иммобилизованные ферменты гексокиназу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, была создана К. Мосбахом в 1970 г. [2, 3]. Сравнение пространственно организованной

ферментной системы и системы, где ферменты находятся в растворе в свободном виде, показало большую эффективность первой относительно второй. Этими же авторами впервые была предложена трехферментная система « β -галактозидаза–гексокиназа–глюкоза-6-фосфатдегидрогеназа» [2, 4], которая, как предполагали, позволит наблюдать кумулятивный эффект.

Три фермента были поверхностно связаны с укрепленной поперечно-сшитой полимерной матрицей [2, 5]. Было показано, что кинетическое поведение связанной с матрицей трехферментной системы по сравнению с аналогичной системой, состоящей из трех несвязанных и находящихся в растворе ферментов, было более эффективно. При этом рост эффективности связанной системы становится заметнее с увеличением числа участвующих ферментов. В настоящее время известно несколько десятков иммобилизованных мультиферментных комплексов, состоящих из двух, трех, четырех и более ферментов, эффективность которых намного выше, чем у свободных ферментов, за счет локального концентрирования субстратов, входящих в систему [2, 6-8].

Новейшие разработки в области мультиферментных амперометрических биосенсоров

На основе лактатдегидрогеназы и пируватоксидазы был разработан простой и чувствительный импедансометрический биферментный биосенсор [2, 9], продемонстрировавший высокую стабильность при работе и хранении, а также высокую селективность с пределом обнаружения 17 и 20 мкМ для слоя лактатдегидрогеназы и слоя пируватоксидазы соответственно (Рис. 2). Была предложена оригинальная методика сочетания лактатдегидрогеназы и пируватоксидазы для определения L-лактата, в которой биосенсор готовили методом капельного покрытия лактатдегидрогеназы, НАД⁺ и пируватоксидазы на поверхности электродов трафаретной печатью, с использованием паров глутарового диальдегида. Определение L-лактата в сложных матрицах показало применимость импедиметрического мультиферментного биосенсора для анализа качества пищевых продуктов и в клинической диагностике.

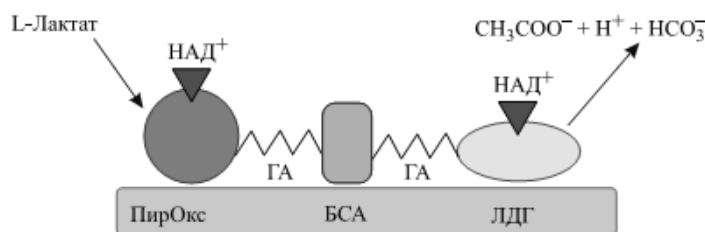


Рис. 2. Схематическое изображение I-лактат-селективного импедиметрического биосенсора на основе биоселективной мембраны

В работе [2, 10], для одновременного детектирования кислорода, глюкозы и лактата с использованием одного сенсора, ферменты лактатоксидаза, пероксидаза и глюкозооксидаза были инкапсулированы в полиэлектролитные капсулы микронного размера. Микрокапсулы готовили послойным осаждением противоположно заряженных полиэлектролитов: полиаллиламин гидрохлорида и полистиролсульфоната на частицы CaCO_3 , в результате чего образовывалась оболочка «полистиролсульфонат/полиаллиламина гидрохлорид». Ферменты находились во внутренней части капсулы, в то время как на поверхности были прикреплены флуоресцентные красители, удерживаемые за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий с полиэлектролитными многослойными оболочками.

Глюконовая кислота, продукт окисления глюкозы, широко распространена в природе и присутствует в различных пищевых продуктах. В работе [2, 11], для определения глюконовой кислоты был разработан амперометрический биосенсор, использующий мультиферментный каскад, состоящий из глюконаткиназы и креатинкиназы, саркозиноксидазы и пероксидазы. Ферменты были иммобилизованы между слоями хитозана на поверхности плоского нанокompозитного электрода, содержащего многостенные углеродные нанотрубки. Измерительная среда содержала аденозинтрифосфат, креатинфосфат и гексацианоферрат (II) в качестве редокс-медиатора. Отклик на присутствие в среде глюконовой кислоты проявлялся в виде изменения величины тока, измеряемого при постоянном напряжении -50 мВ. Биосенсор обладал линейностью в диапазоне от 4 до 620 мкМ с пределом обнаружения 2,6 мкМ, чувствительностью $45,3 \text{ нА} \cdot \text{мкМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ и временем ответа 70 с. Достоинство данной конструкции заключалось также в том, что используемые при создании биосенсора ферменты были доступны, дешевы, стабильны и эффективно функционировали в подходящих рабочих условиях, что позволяло изготавливать чувствительные, надежные и стабильные биосенсоры. Указанный мультиферментный биосенсор был применен для анализа глюконовой кислоты в различных сулах и винах без какой-либо предварительной обработки. Полученные с использованием биосенсора результаты измерений не отличались от результатов эталонных измерений методом жидкостной хроматографии.

Биферментный биосенсор на основе пероксидазы хрена и глюкозооксидазы был сконструирован путем гибридизации *in situ* ковалентно связанной органико-неорганической биокompозитной пленки, которая обладала высокой стабильностью в кислотном растворе [2, 12].

Для обнаружения в водных растворах двух различных сахаридов – лактозы и глюкозы – в трехэлектродном амперометрическом биосенсоре глюкозооксидаза и β -галактозидаза были ко-иммобилизованы на графитовом рабочем электроде [2, 13]. Лактозный биосенсор показал линейный диапазон до 0,010 мМ с пределом обнаружения и чувствительностью, равной 0,001 мМ и 850 ± 81 мкА/мМ соответственно, и был испытан на реальных образцах – фруктовых соках, обезжиренном молоке и сыворотке.

Способы иммобилизации фермента

Авторами [14-16] была осуществлена иммобилизации фермента путем смешивания раствора мономера с ферментом, который во время полимеризации оказывается захваченным в его пространственную сетку.

После 9-11 раз использования чувствительность биосенсора почти линейно снижалась (Рис. 3), на основе чего было сделано предположение, что этот способ ведет к постепенному вымыванию фермента из носителя в водных растворах и в полярных растворителях, что может быть обусловлено чрезвычайно хорошей растворимостью казеина либо геля, взятых за основу носителя.

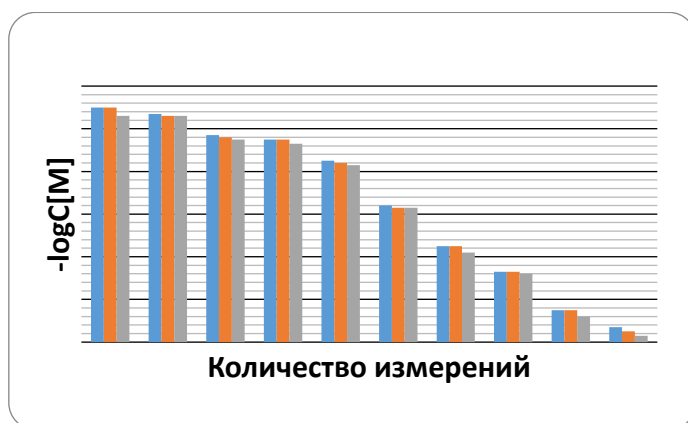


Рис. 3. Иммобилизация путем смешивания раствора мономера с ферментом

Иммобилизация фермента с параллельным введением комплекса Cu(His) (меди и гистидина) в работе [17] путем механического перемешивания в гелевую структуру, содержащую альбумин, глутаровый альдегид и азид натрия продемонстрировала неудовлетворительные результаты (Рис. 4) – биосенсор продемонстрировал резкое снижение чувствительности уже на момент второго использования. Вероятно, вследствие воздействия на фермент агрессивных сред, входящих в состав раствора полимера, произошла денатурация и инактивация ферментов. Изготовленные биосенсоры

имели низкую активность иммобилизованных ферментов относительно нативной величины (45-75%).



Рис. 4. Иммобилизация фермента на водонерастворимых твердых носителях механическим перемешиванием

На стеклоуглеродном электроде по методике работы [18] была проведена иммобилизация путем обработки ди-(С₁₋₆алкил)амино-С₁₋₆алкилцеллюлозы, модифицированной О-сульфонатом циануровой кислоты, водным раствором фермента ловастатин эстеразы. В серии измерений биосенсор выдал однократный отклик (Рис. 5). Предположительно, причина кроется в низкой прочности связи фермент-полимер, вследствие чего фермент попросту смывается при проведении анализов в водных средах [14].

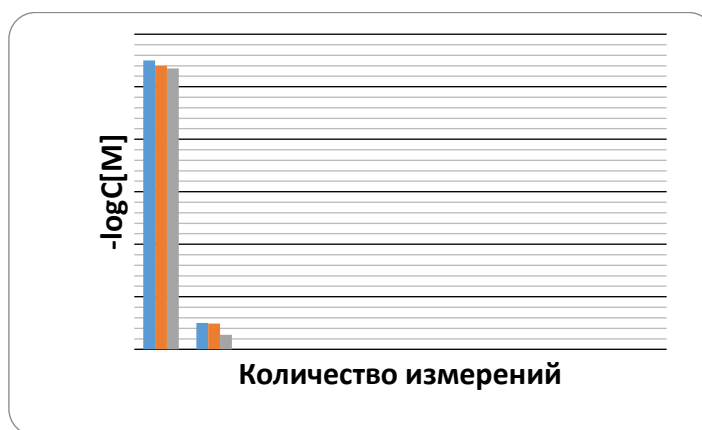


Рис. 5. Иммобилизация обработкой электрода водным раствором фермента

Полученный путем перевода растворимой формы белка в форму сшитого кристалла по методике [19] биосенсор полностью не

удовлетворял предъявляемым требованиям: сохранение высокой каталитической активности по отношению к определяемому компоненту, структурной целостности и стабильности отклика при хранении. В указанном способе иммобилизация фермента гидролазы проводилась при смешении на вальцах постепенным включением его в структуру полимера при температуре 37⁰С. В результате такой иммобилизации фермент полностью денатурировался в процессе включения в полимерную пленку и как следствие отклика биосенсора не наблюдалось. Было высказано предположение, что инактивации фермента способствовали повышенная температура совместно с механическим воздействием.

Существующие способы нанесения и иммобилизации фермента или системы ферментов в структуру носителя не обеспечивают должной стабильности в работе биосенсора. Вместе с тем, исследования мультиферментных систем видятся достаточно перспективным направлением исследований. В совокупности данные факты обуславливают необходимость дальнейших поисков более совершенных решений в области оптимизации ферментных биосенсоров.

Финансирование:

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 19-08-00186).

Список литературы

1. Rocchitta G., Spanu A., Babudieri S. [et al.] // *Sensors* (Basel). 2016 V. 16. P. 680-688.
2. Ибадуллаева С.Ж., Аппазов Н.О. // *Биофизика*. 2019. Т. 64. № 5. С. 869–882.
3. Mosbach K., Mattiasson B. // *Acta Chem. Scand*. 1970. V.24. P. 2093-2098.
4. Mattiasson B., Mosbach K. // *Biophys. Acta. Enzymology* 1971. V. 235. P. 253-260.
5. Axén R., Porath J., Ernback S. // *Nature*. 1967. V. 214. P. 1302-1310.
6. Findrik Z., Vasić-Rački Đ. // *Chem. Biochem. Engineer. Quart*. 2009. V. 23. P. 545-550.
7. Schoffelen S., van Hest J.C.M. // *Soft Matter*. 2012. V. 8. P. 1736-1742.
8. Wang X., Li Z., Shi J. // *ACS Catal*. 2014. V. 4. P.962-968.
9. Chan D., Barsan M.M., Korpan Y., Brett C.M.A. // *Electrochim. Acta*. 2017. V. 231. P. 205–231.
10. Kazakova L.I., Shabarchina L.I., Anastasova S. [et al.] // *Bioanal. Chem*. 2013. V. 405. P. 1559-565.
11. Stredansky M., Martínez J.M.O., Stredansky M., Labuda J. // *Int. J. Electrochem. Sci*. 2017. V. 12. P. 1183-1188.
12. Li F., Wang Z., Feng Y. // *Sci. China Ser. B Chemistry*. 2009. V. 52. P. 2269-2278.
13. Portaccio M., Lepore M. / *J. Sensors*. 2017. V. 2. P. 1-8.

14. Гумерова Г.И., Гоголь Э.В., Егорова О.С., Кузнецова О.Н. // Вестник технологического университета. 2016. Т.19. №22. 8 с.
15. Windal I., Denison M.S., Birnbaum L.S., [et al.] // Environ Sci Technol. 2005. V. 39. P. 7357–7364.
16. Патент РФ №2294369 Способ получения иммобилизованной уреазы: заявл. 17.05.2004: опубл. 27.05.2007 / Анисенко О.В., Бородина Т.Н., Воробьева О.В., Кунижев С.М., Филь А.А.
17. Патент РФ №2010858 Способ иммобилизации алкогольоксидазы: заявл. 03.07.1991: опубл. 15.04.1994 / Марцинкявичене Й.А., Кулис Ю.Ю., Лауринавичюс В.А.
18. Патент РФ №2475538 Фермент ловастатин эстераза, иммобилизованный на твердом носителе, способ иммобилизации фермента, биокатализируемый проточный реактор и способ очистки симвастатина: заявл. 18.11.2008: опубл. 20.02.2013 / Кошелевский Д., Курек В., Осташевский Р., Патральская Д.
19. Патент РФ №2124052 Кристалл белка, сшитого многофункциональным сшивающим агентом (варианты), устройство, содержащее этот кристалл, и способ получения аспартама: заявл. 30.07.1991: опубл. 27.12.1998/ Нэвиа М. А., Клэр Н. Л.Ст.

Об авторах:

ГУМАНОВ Григорий Алексеевич – студент 2 курса магистратуры, Тверской государственной технической университет, grishatumanoff@yandex.ru.

ЛАКИНА Наталия Валерьевна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, Тверской государственной технической университет, химико-технологический факультет, lakina@yandex.ru.

ДОЛУДА Валентин Юрьевич – доктор химических наук, профессор кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, Тверской государственной технической университет, химико-технологический факультет, doludav@yandex.ru.

СУЛЬМАН Михаил Геннадьевич – доктор химических наук, профессор кафедры биотехнологии, химии и стандартизации Тверской государственной технической университет, химико-технологический факультет, sulmanmichail@online.tver.ru.

MODERN TRENDS IN THE DEVICE OF ENZYME AMPEROMETRIC BIOSENSORS

G.A.Tumanov, N.V. Lakina, V.Y. Doluda, M.G. Sulman

Tver State Technical University, Tver

To date, many studies have been devoted to the optimization of biosensors by means of various methods of application or selection of effective systems of redox enzymes. The article provides an overview of methods for obtaining biosensors, including such enzyme systems as lactate dehydrogenase / pyruvate oxidase, lactate oxidase / peroxidase / glucose oxidase, gluconate kinase and sarcosine kinase / creatosine / peroxidase, peroxidase / glucose oxidase, glucose oxidase / β -galactosidase. The influence of the principles of immobilization and the amount of enzymes on the efficiency of the resulting biosensors was analyzed - multienzyme biosensors containing two or more enzymes demonstrated promising stability and selectivity, which indicates that research in this direction is promising.

Keywords: *biosensor, enzymes, electrochemical signal, enzyme immobilization.*