

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ

Інститут мікробіології та вірусології

На правах рукопису

КОРЦАН

Ярослав Ізидорович

**РОЗРОБКА БІОСЕНСОРІВ СПЕЦИФІЧНИХ ДО МЕТАНОЛУ,
ЕТАНОЛУ ТА ФОРМАЛЬДЕГІДУ НА ОСНОВІ КЛІТИН
МЕТИЛОТРОФНИХ ДРІЖДЖІВ**

03.00.23 — біотехнологія

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

Київ — 1994



00755767 (.)

AB 31.268

механізмів трансляції генетичної
інформації Інституту молекулярної біології та генетики НАН України
(м. Київ) та відділенні регуляторних систем клітини Інституту біохімії
ім. О.В.Палладіна НАН України (м. Львів)

Наукові керівники:

доктор біологічних наук,
М.Ф.Стародуб
доктор біологічних наук,
професор А.А.Сибірний

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук,
професор Г.М.Кременчуцький
доктор біологічних наук,
професор Р.І.Гвадін

Провідна установа:

Київський медичний університет,
кафедра біохімії (м.Київ)

Захист дисертації відбудеться 21 грудня 1994 р. о 10⁰⁰ на
засіданні спеціалізованої ради Д 016.06.01 по захисту докторських
дисертацій при Інституті мікробіології та вірусології ім
Д.К.Заболотного НАН України за адресою: 252143, Київ - 143, вул.
акад. Заболотного, 154

Автореферат дисертації розіслано 17 листопада 1994 р.

Вчений секретар
Спеціалізованої Ради
кандидат біологічних наук *Гуцул* - Пуриш Л.М.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Експресний, високоселективний, точний та високочутливий кількісний аналіз спиртів та альдегідів - один із важливих напрямків у сучасній аналітичній практиці, включаючи клініко-токсикологічні дослідження та аналіз у фармацевтичній, мікробіологічній і харчовій промисловостях, екологічний моніторинг навколишнього середовища. Для цієї мети використовуються як класичні хімічні методи, так і ензимні хромогенні системи та біосенсорні пристрої. Особливо перспективними є сенсори на базі напівпровідникових структур, оскільки вони здатні інтегрувати реєструючу та перетворюючу функції. Біосенсори на цій основі мають ряд суттєвих переваг у порівнянні з іншими сенсорними системами: порівняно малий розмір, можливість створення мультифункціональних чіпів, хороша відтворюваність результатів, винятково висока чутливість, низька ціна робочих елементів при масовому виробництві, що дозволяє виготовляти датчики одноразового використання. Перспективними видаються біосенсори на основі цілих клітин мікроорганізмів. Слід зазначити, що такі системи уже розроблено для аналізу деяких речовин, у тому числі і етанолу із застосуванням рН-чутливих польових транзисторів (рН-ПТ) та оцтово-кислих бактерій, проте селективність більшості із них дуже низька і визначається специфікою метаболізму клітин мікроорганізмів. Можливим шляхом підвищення селективності клітинних датчиків є отримання мутантних мікроорганізмів, у яких генетичний блок певних ланок метаболізму може знизити селективність клітинного відгуку.

У зв'язку з цим видалось актуальним вивчити можливість зміни закислювальної здатності клітин метилотрофних дріжджів шляхом введення певних генетичних блоків окислення метанолу,

етанолу та формальдегіду на стадії утворення органічних кислот і дослідити можливість створення високоселективних клітинних біосенсорних пристроїв, чутливих до метанолу, етанолу та формальдегіду, на основі генетично сконструйованих штамів дріжджів із застосуванням напівпровідникових та кондуктометричних перетворювачів.

Мета та завдання дослідження. Метою даної роботи було створення лабораторних моделей біосенсорів на основі інтактних клітин метилотрофних дріжджів для визначення концентрації метанолу, етанолу та формальдегіду.

Основним завданням роботи було:

1. Пошук мутантів метилотрофних дріжджів із підвищеною закислювальною здатністю.
2. Вивчення механізму екструзії протонів, що індукується формальдегідом, у клітин метилотрофних дріжджів
3. Вивчення шляхів ефективної іммобілізації дріжджових клітин на поверхні метало-керамічних перетворювачів.
4. Конструювання варіантів клітинних сенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів та планарних електродів.
5. Вивчення робочих параметрів сконструйованих сенсорних систем на базі клітин мікроорганізмів.

Наукова новизна та практична цінність роботи. Підібрано мутанти метилотрофних дріжджів з генетично детермінованою селективністю відносно метанолу, етанолу та формальдегіду, проведено їх аналіз та охарактеризовано рушійні сили процесу екструзії протонів, що індукується формальдегідом.

Вперше дикі та мутантні клітини метилотрофних дріжджів родів *Hansenula polymorpha*, *Candida boidinii* та *Pichia pinus* застосовано як основу чутливого біоелемента сенсора, створено лабораторні моделі клітинних біосенсорів на основі зазначених вище

клітин та рН-чутливих польових транзисторів і планарних електродів як трансдукторів для визначення концентрації метанолу, етанолу та формальдегіду.

Практична цінність роботи полягає у тому, що отримані в ній результати свідчать про принципову можливість створення макетів та промислових варіантів мікробних сенсорів для визначення концентрації різноманітних первинних спиртів та альдегідів у медичній практиці, контролі технологічних процесів у промисловості та при проведенні екологічного моніторингу навколишнього середовища, зокрема, для аналізу концентрації метанолу, етанолу та формальдегіду у водних та слабо забуферених розчинах.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається із вступу, огляду літератури, експериментальної частини, результатів, обговорення, висновків та списку літератури, який включає 159 найменувань. Робота викладена на 100 сторінках машинописного тексту та містить 17 малюнків та 10 таблиць.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідались на 15-ому міжнародному симпозиумі по дріжджах (Рига-Юрмала, Латвія, 1991), симпозиумі по біосенсорам (Енсхеде, Нідерланди, 1991), 16-ій міжнародній конференції по генетиці та молекулярній біології дріжджів (Відень, Австрія, 1992), симпозиумі "Євросенсори IV" (Сан-Себастьян, Іспанія, 1992), спільній робочій нараді "Німеччина-СНД" (Мюнстер, ФРН, 1993), 6-ому Європейському конгресі з біотехнології (Флоренція, Італія, 1993).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 8 журнальних статей.

Всі дослідження виконано з ініціативи автора та за його безпосередньою участю в експериментах і аналізі отриманих результатів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі використовували такі штами метилотрофних дріжджів: "дикий тип" – *Hansenula polymorpha* 34 (met9-2), отриманий від д-ра P.Sudbery (Шеффілд, Великобританія), *Pichia pinus* 1031 та *Hansenula polymorpha* 356 (leu2), люб'язно переданий для досліджень д-ром Л.П.Тихомировою (Пущино, Росія), *Candida boidinii* 706, переданий для експериментів д-ром С.С.Нагорною та мутантні штами: *Hansenula polymorpha* 34-19 (дефектний по форміатдегідрогеназі), *Hansenula polymorpha* A3 (штам з відсутньою активністю формальдегідредуктази) та A3-11 (з порушеною індукцією синтезу алкогольоксидази та форміатдегідрогенази форміатом та відсутньою активністю формальдегідредуктази), люб'язно передані для досліджень д-ром В.М.Убийвовк і *Pichia pinus* 2468 (*ade2 arg1 acs2*, штам із блоком синтезу ацетил-SKoA-синтетази), переданий для досліджень д-ром В.І.Титоренком.

Клітини вирощували за постійної аерації (240 об./хв) при 30°C у рідкому середовищі такого мінерального складу, г/л: KH_2PO_4 – 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; CaCl_2 – 0,1, як описано раніше [Корпан и др., 1992; Корпан et al., 1993]. Біомасу клітин визначали за розсіюванням світла при 540 нм, як описано раніше [Гончар и др., 1990]. Безпосередньо перед експериментами клітини осаджували при 3500g та двічі промивали дистильованою водою.

Закислення середовища клітинами метилотрофних дріжджів, що індукуються метанолом або формальдегідом, реєстрували, як описано у роботі [Гончар и др., 1990]. У дослідгах із інгібіторами гідрофобні речовини розчиняли у етиловому спирті, додаючи його до водної суспензії клітин у такій кількості, щоб концентрація спирту в інкубаційному середовищі не перевищувала 1%, інкубували

протягом 5 хв, а потім додавали індуктор закислення – метанол або формальдегід.

Активності ферментів обміну метанолу визначали у безклітинних екстрактах, отриманих руйнуванням клітин за допомогою скляних кульок діаметром 0,45-0,5 мм при 4°C протягом 4 хв. Концентрацію білку визначали за методом Лоурі [Lowry, 1950]. Активності ферментів визначали як описано раніше: алкогольоксидази [Сибирный и др., 1987], формальдегіддегідрогенази [Schutte et al., 1976], формальдегідредуктази [Hou et al., 1982], форміатдегідрогенази [Schutte et al., 1976]. Аналіз форміату проводили ферментативно [Johnson et al., 1964].

Клітини мікроорганізмів іммобілізували на поверхні польових транзисторів (ПТ) або золотих планарних електродів (ПЕ) у Са-альгінатному гелі, як описано [Kogran et al., 1993].

Дослідження проводили на чіпах виробництва НДІ "Мікропроцесор" (Київ) та інноваційного центру "Емокон" (Київ). Особливості конструкції та функціональні параметри обох типів трансдукторів описано детально у роботах [Kogran et al., 1994].

Концентрацію спиртів та формальдегіду визначали у скляній комірці об'ємом 2,5 мл, яка була заповнена дистильованою водою або "поліміке" буфером [Olsson, 1988]. Для стабілізації альгінатного гелю у деяких випадках додавали 20 мМ розчин CaCl_2 . Для датчика, вміщеного у вимірювальну кювету, фіксували базову лінію, після чого вносили аліквоту метанолу, етанолу чи формальдегіду. Зміну потенціалу або провідності на сенсорному чіпі реєстрували автоматично за допомогою самописця або ІВМ комп'ютера. Всі виміри проводили у диференційному режимі, при кімнатній температурі за умов інтенсивного перемішування. Максимальна швидкість відгуку сенсора $(dU/dt)_{\text{макс}}$ була мірою концентрації аналізованої речовини у розчині.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Пошук мутантів метилотрофних дріжджів із підвищеною здатністю до екструзії протонів.

Раніше були отримані мутанти метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* 34-19 і *P. pinus* 2468, вивчені особливості їх метаболізму [Sibirny et al., 1990; Tolstorukov et al., 1989]. У першого мутанта блок форміатдегідрогеназної реакції зупиняє процес окислення метанолу на утворенні мурашиної кислоти (рис. 1), що призводить до посилення процесу екструзії протонів (питома швидкість закислення 20-30 нмоль H^+ за 1 хв на 1 мг сухої маси клітин) у порівнянні із штамом дикого типу *H. polymorpha* 34 (швидкість закислення 3-5 нмоль H^+ за 1 хв на 1 мг сухої маси клітин).

Метилотрофні дріжджі дикого типу не закислоють середовище з екзогенним етанолом [Гончар и др., 1990], проте генетичне пошкодження ацетил-SКоА-синтетази у мутанта *P. pinus* 2468 (рис. 1) викликає появу ефективного викиду протонів у симпорті з ацетат аніонами, внаслідок блокування окислення етанолу на етапі перетворення ацетату до ацетил-SКоА (питома швидкість закислення складає 12-14 нмоль H^+ за 1 хв на 1 мг сухої маси клітин).

Штам *Hansenula polymorpha* АЗ-11 було відібрано серед колоній формальдегід-чутливих мутантів і встановлено, що він характеризується відсутністю активності одразу трьох ферментів: формальдегідредуктази, алкогольоксидази та форміатдегідрогенази (рис. 1). Однак слід зазначити, що блок синтезу алкогольоксидази та форміатдегідрогенази спостерігається лише у клітин, вирощених на середовищі з сумішшю 0,2% гліцерину та 20 мМ форміату, рН 5,0 (табл. I)

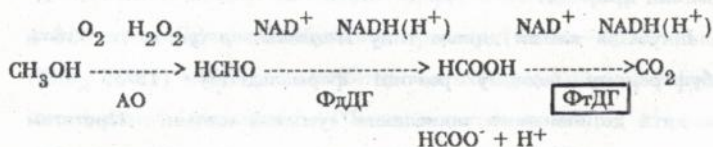
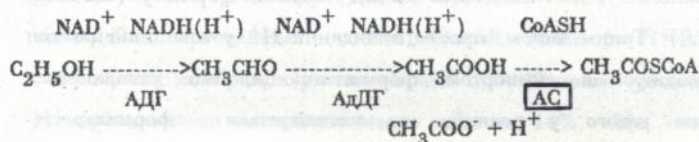
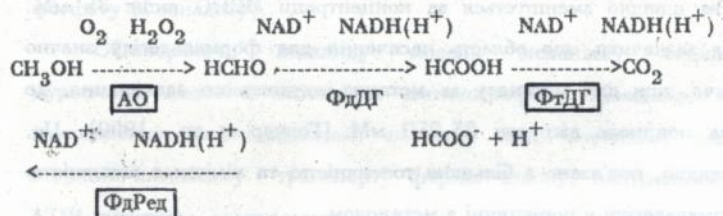
A. *HANSENULA POLYMORPHA* 34-19B. *PICHA PINUS* 2468C. *HANSENULA POLYMORPHA* А3-11

Рис. 1. Схема окислення метанолу, етанолу та формальдегіду клітинами мутантних штаміл метилотрофних дріжджів.

Позначення: АО — алкогольоксидаза; ФлДГ — формальдегідегідрогеназа; ФтДГ — формиатдегідрогеназа; ФлРед — формальдегідредуктаза; АДГ — алкогольдегідрогеназа; АцДГ — ацетальдегідегідрогеназа; АС — ацетил-SКоА-сингетаз; рамка — генетичне пошкодження ферментів.

Формальдегід-індуковане закислення середовища та його біохімічна природа.

Інкубація клітин дикого типу *Hansenula polymorpha* 356 в незабуференому водному розчині формальдегіду (15-35 мМ) призводить до швидкого закислення суспензії клітин. Протягом декількох хвилин спостерігається зсув рН суспензії на 1,5 одиниці та більше за вихідного значення рН 5,3-5,5. Встановлено, що інкубаційне середовище, закислене за присутності 20 мМ формальдегіду, містить досить великі кількості форміату (0,6 мМ, рН 4.0). Таким чином, процес викидання H^+ у зовнішній розчин супроводжується симпортом форміат-аніонів, які утворюються скоріше всього у реакції, що каталізується формальдегід-дегідрогеназою.

Швидкість закислення зростає із збільшенням концентрації формальдегіду та характеризується насиченням при 25-35 мМ, а потім швидко зменшується за концентрації НСНО вище 35 мМ. Слід зазначити, що область насичення для формальдегіду значно вузла, ніж для метанолу за метанол-індукованого закислення, де вона покриває діапазон 25-250 мМ [Гончар и др., 1990]. Це, очевидно, пов'язано з більшою токсичністю та хімічною активністю формальдегіду у порівнянні з метанолом.

Швидкість формальдегід-залежного закислення середовища прямо пропорційна концентрації клітин *H. polymorpha* 356, як і у випадку метанол-індукованого закислення [Гончар и др., 1990], і залежить від рН середовища з оптимумом у діапазоні 4.0-4.5. Це, можливо, перш за все, зумовлено властивостями плазмалемної H^+ -АТФ-ази, яка має максимальну активність у кислому діапазоні рН [Goffeau et al., 1981].

Якщо виділення клітинами протонів здійснюється проти існуючого градієнту концентрації H^+ , то цей процес мусить

залежати від енергетичного статусу клітин. Було проведено дослідження впливу інгібіторів енергетичного обміну на процес закислення. Суттєве інгібування процесу (більше 80%) викликає NaN_3 (0,1 мМ) - інгібітор мітохондріальних ферментів - термінальної оксидази і АТФази, а також антимицин А (4 мкМ). Незначне зниження швидкості закислення спостерігається за присутності протонифору - 3-хлоркарбоніліцианід-фенілгідразону (ХКФ, 0,01 мМ) та неспецифічного інгібітора АТФ-аз - дициклогексил-карбодіміду (ДЦКД, 0,5 мМ) - на 55% і 56% відповідно. Ортованадат - специфічний інгібітор H^+ -АТФази плазматичних мембран - у концентрації 0,1 мМ пригнічує виділення H^+ дріжджовими клітинами всього лиш на 44%. Це, очевидно, зв'язано з його низькою проникністю в клітини дріжджів, вирощених на середовищі з високим вмістом фосфатів [Bowman, 1983], внаслідок репресії високоафінної системи транспорту фосфату (і ванадату).

Обговорюючи можливу модель механізму виділення мурашиної кислоти, клітинами метилотрофних дріжджів, який викликається формальдегідом, перевагу слід, очевидно, віддати вторинно-активному транспорту форміат-аніону, контрольованого АТФ-залежною електрогенною H^+ -помпою плазмалемми, як і за випадку метанол-індукованого закислення [Гончар и др., 1990]. Роль мітохондрій, очевидно, полягає в окисненні НАДН і регенерації НАД^+ , який споживається в процесі цитоплазматичного окислення формальдегіду, у генерації АТФ, який споживається за переносу іона H^+ через плазматичну мембрану.

Активності ферментів обміну метанолу і рівні закислення у дикого і мутантних штабів метилотрофних дріжджів, вирощених у середовищах з метанолом, етанолом, глюкозою чи сумішшю форміату з глицерином, представлені в табл. 1 і 2.

Таблиця 1. Активності ферментів обміну метанолу у дикого та мутантних штамів *H. polygrapha* в залежності від типу ростового субстрату. Коефіцієнти варіації паралельних визначень у одній і тій же ж серії дослідів складає 5-10%. Приводяться середні значення активностей у трьох незалежних серіях дослідів.

Скорочення: АО — алкогольоксидаза; НСНО-ДГ — формальдегіддегідрогеназа; НСНО-Ред — формальдегідредуктаза; НСООН-ДГ — форміатдегідрогеназа

Штами	Ростовий субстрат	Питома активність ферменту, дмоль за 1 хв на 1 мг білка			
		АО	НСНО-ДГ	НСНО-Ред	НСООН-ДГ
356 (дикий тип)	Метанол	0,950	0,802	0,803	0,152
	Етанол	0,000	0,004	0,500	0,001
	Глюкоза	0,000	0,002	0,910	0,000
	Гліцерин				
	+ форміат	0,930	0,099	0,012	0,032
А3 (мутант)	Метанол	1,270	0,912	0,003	0,139
	Етанол	0,000	0,121	0,000	0,009
	Глюкоза	0,000	0,049	0,000	0,000
	Гліцерин				
	+ форміат	1,100	0,123	0,000	0,031
А3-11 (мутант)	Метанол	1,370	0,846	0,000	0,025
	Етанол	0,000	0,051	0,031	0,000
	Глюкоза	0,000	0,026	0,000	0,000
	Гліцерин				
	+ форміат	0,000	0,013	0,000	0,000

Для всіх штамів відсутність метанол-залежного закислення у клітин, вирощених на глюкозі або етанолі, пояснюється повною репресією

першого ферменту обміну метанолу — алкогольоксидази. Формальдегіддегідрогеназа також підлягає глюкозній і етанольній катаболітній репресії, однак не у повній мірі, що, очевидно, пояснює збереження здатності до формальдегід-залежного викиду H^+ у клітин *Hansenula polymorpha* 356 і похідних від нього мутантів АЗ і АЗ-11 при рості на середовищі з корепресорами. Можна уявити конститутивність системи окислення формальдегіду у дріжджів *H. polymorpha*. Проте це не узгоджується із загальноприйнятою природою регуляції синтезу глутатіон-залежної формальдегіддегідрогенази у клітин дикого типу метилотрофних дріжджів. Таке протиріччя може бути вирішено припущенням, що у метилотрофних дріжджів, окрім уже відомої метанол-індукованої формальдегіддегідрогенази, існує якась альтернативна ферментна система окислення формальдегіду, яка не підлягає регуляції ростовим субстратом.

Очікувалось, що введення в штаб 356 генетичного блоку формальдегідредуктази може прискорити процес закислення, внаслідок посилення потоку окислення формальдегіду до мурашиної кислоти. Проте у дійсності (табл. 1) були отримані суперечливі результати: спостерігається як інтенсифікація, так і сповільнення швидкості закислення у випадку штаба АЗ. Можливо, функціонування формальдегідредуктази *in vivo* обмежено в зв'язку з утворенням футильного циклу, у результаті чого блокування синтезу цього фермента не приводить до суттєвого підсилення процесу окислення формальдегіду.

За росту клітин *H. polymorpha* дикого типу на суміші гліцерину (індиферентний до регуляції метилотрофного обміну субстрат) і форміату (індуктор синтезу ферментів обміну метанолу) також індукується система закислення, специфічна як до формальдегіду, так і метанолу. У той же час у мутанта

H. polymorpha A3-11 з порушеною індукцією алкогольоксидази і форміатдегідрогенази форміатом, але не метанолом, за умов росту на середовищі з сумішню гліцерину з форміатом спостерігається тільки формальдегідзалежне закислення (табл. 1 і 2).

Таблиця 2. Швидкості закислення середовища інкубації клітин дикого та мутантних штамів *H. polymorpha*, індукованого метанолом чи формальдегідом, в залежності від типу ростового субстрату.

Штами	Ростовий субстрат	Питома швидкість закислення, ммоль Н ⁺ за 1 хв на 1 мг сухої маси клітин	
		метанол	формальдегід
356 (дикий тип)	Метанол	9,93	15,32
	Етанол	0,00	6,86
	Глюкоза	0,00	4,50
	Гліцерин + форміат	12,81	8,04
A3 (мутант)	Метанол	5,07	6,73
	Етанол	0,00	9,61
	Глюкоза	0,00	6,21
	Гліцерин + форміат	9,32	4,08
A3-11 (мутант)	Метанол	23,1	23,8
	Етанол	0,00	6,46
	Глюкоза	0,00	3,96
	Гліцерин + форміат	0,00	6,85

Індукція алкогольоксидази метанолом у цього мутанта не порушена, у зв'язку з чим для клітин, вирощених на метанолі, специфічність

закислення така ж, як у дикого штама. Швидкості метанол- і формальдегід-залежного закислення у клітин мутанта АЗ-11, вирощеного в середовищі з метанолом, помітно вищі, аніж для батьківських штамів. Можливо, це пов'язано з неповною індукцією форміатдегідрогенази у клітин мутанта АЗ-11 (табл. 1). Слід зазначити також, що при підвищенні специфічності закисловоальної здатності мутантних клітин АЗ-11, вирощених на середовищі з гліцериним і форміатом, питома швидкість формальдегід-залежного виділення H^+ цими клітинами нижча, ніж за росту на метанолі. Це не зовсім тривіальний результат, так як очікувалось, що порушення індукції форміатдегідрогенази у клітин, вирощених на середовищі з гліцериним і форміатом, повинно блокувати перетворення мурашиної кислоти і, таким чином, посилити її виділення в інкубаційне середовище. Можливо, це пояснюється зниженням у цього мутанта активності формальдегіддегідрогенази - фермента, що каталізує утворення мурашиної кислоти. Не виключається також і конкурентний вплив на окислення $HCHO$ до $HCOOH$ і дигідроксенацетонсинтазної реакції ксилулозомоно-фосфатного циклу асиміляції формальдегіду. Складається враження, що закисловоальна активність клітин метилотрофних дріжджів залежить не стільки від абсолютних величин активностей ферментів, що приймають участь у метаболізмі C_1 -сполук, скільки від їх співвідношення, наприклад, відношення активності форміатдегідрогенази до активності формальдегіддегідрогенази.

Вивчення робочих характеристик клітинних біосенсорів для визначення концентрації метанолу та етанолу на основі рН-ПТ.

Для створення клітинних біосенсорів для визначення концентрації метанолу та етанолу використовували мутантні клітини *H. polymorpha* 34-19 та *P. pinus* 2468 відповідно.

Локальне закислення середовища, яке індукується клітинами, спричиняє зміну заряду на поверхні іон-селективної мембрани (Si_3N_4), яка виконує роль затвору рН-чутливого польового транзистора і реєструється за допомогою самописця. На рисунку 2 представлена характерна крива відгуку сенсорів, чутливих до метанолу чи етанолу, яка характеризується наявністю незначного лаг-періоду і має вид гіперболи. Через 20-25 хв відгук досягає максимального рівня, що зумовлено, очевидно, встановленням рівноваги між процесами продукції протонів у мембрані та їх дифузії у аналізований розчин.

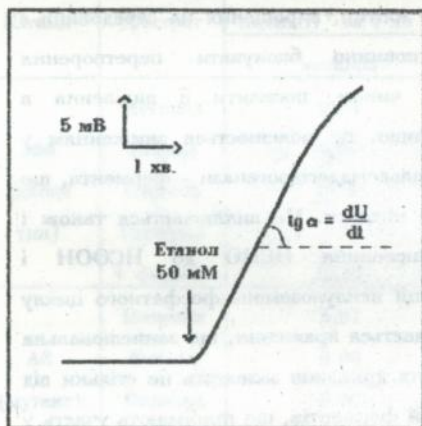


Рис. 2. Типова крива відгуку клітинного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів у дистильованій воді за концентрації клітин (*P.pinus* 2468) 10 мг/мл.

Вивчаючи залежність швидкості зростання відгуку біосенсорів від концентрації метанолу чи етанолу досліджено, що мінімальний рівень спиртів, який можна визначити, в обох випадках складе 0,5 мМ, а лінійний діапазон цієї залежності знаходиться у межах 5-100 мМ аналіту (рис. 3).

Показано, що амплітуда сигналу клітинного сенсора надзвичайно сильно зменшується при збільшенні буферної ємності аналізованого розчину (рис. 4). Сене цього феномену полягає у тому, що компоненти буферу дифундують у мембрану, яка містить

клітини, зменшуючи концентрацію вільних протонів, які генеруються як клітинний відгук.

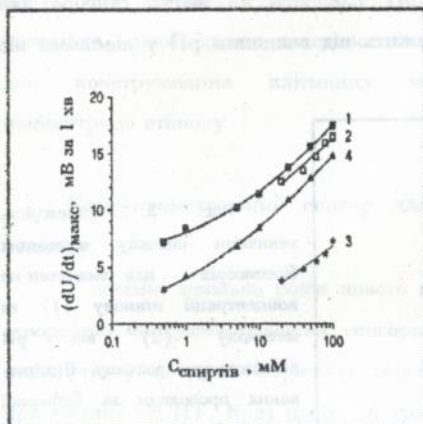


Рис. 3. Калібрувальні криві для специфічних клітинних біосенсорів на основі рН-ПТ, чутливих до етанолу (1 - дистильована вода; 2 - 0,5 мМ/рН та 3 - 2,0 мМ/рН "полімікс" буфер, рН 7,0;) і метанолу (4 - дистильована вода). Концентрація клітин у біомембрані складає 8 мг/мл.

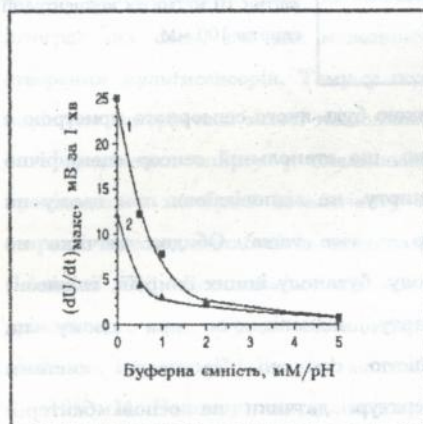


Рис. 4. Залежність відгуку сенсорів на етанол (1) та метанол (2) від буферної ємності розчину. Дослідження проводили у полімікс" буфері, рН 6,0; концентрація клітин у мембрані 10 мг/мл; концентрація спиртів 100 мМ.

Для вивчення залежності відгуку сенсора від величини рН застосовували мультикомпонентний "полімікс" буфер, який характеризується стабільною буферною ємністю у діапазоні рН від 4 до 9. Це дозволяє визначати реальну рН залежність відгуку клітинного біосенсора, оскільки за зміни рН аналізованого розчину

буферна смісь його залишається незмінною. Встановлено, що крива рН-залежності етанольного датчика має куполоподібний вигляд з максимумом при рН 7,0, тоді як відгук сенсора для визначення метанолу не залежить від величини рН у діапазоні від 5,0 до 8,0 (рис. 5).

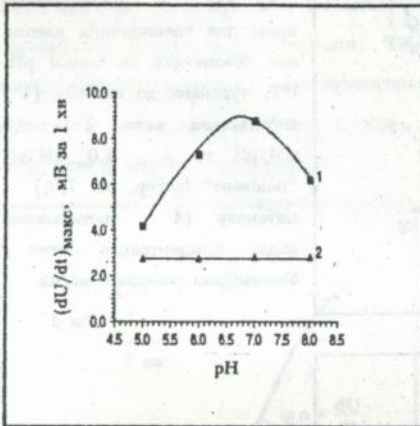


Рис. 5. Залежність величини сигналу клітинних біосенсорів для визначення концентрації етанолу (1) та метанолу (2) від рН аналізованого розчину. Вимірювання проводили за буферної смісності 1 мМ/рН, концентрації клітин 10 мг/мл та концентрації спиртів 100 мМ.

Важливою характеристикою будь-якого сенсорного пристрою є його селективність. Досліджено, що етанольний сенсор специфічно реагує на додавання цього спирту, не відповідаючи при цьому на метанол; метанольний сенсор – *vice versa*. Обидва датчики не реагують на внесення пропанолу, бутанолу інших спиртів, глюкози, ацетату, форміату чи лактату, відповідаючи при цьому на формальдегід. За селективністю створені біосенсорні системи переважають описані у літературі датчики на основі бактерій *Acetobacter aceti* та алкогольоксидази [Kitagawa et al., 1987].

Але не дивлячись на всі переваги запропонованих клітинних біосенсорів для роздільного визначення спиртів їм притаманні деякі вади – низька стабільність робочих елементів (датчики одноразового застосування) за функціонування та зберігання. Для вирішення цієї проблеми було проведено пошук мікроорганізмів, які здатні до росту

на середовищі з етанолом та характеризуються високим рівнем закислення у відповідь на додавання C_2H_5OH серед штамів дикого типу роду *Candida*. Встановлено, що клітини *C. boidinii* 706 володіють необхідними властивостями і можуть бути застосовані для конструювання клітинних мікросенсорів для аналізу концентрації етанолу.

Кондуктометричний сенсор для визначення концентрації етанолу.

У останні декілька років нового піднесення набули роботи по створенню кондуктометричних сенсорних пристроїв. Це зумовлено наявністю у кондуктометричних сенсорів таких же переваг, які притаманні рН-ПТ. Крім цього, ці трансдуктори порівняно дешеві, легко конструюються за допомогою використання технології інтегральних схем, що дає можливість масового виробництва та створення мультисенсорів. Тому у подальших експериментах було вирішено використати золоті тонкоплівкові планарні електроди.

Додавання спирту у аналізований розчин спричиняє зміну провідності у мембрані із альгінату кальцію за рахунок процесу секреції кислих метаболітів клітинами метилотрофних дріжджів *C. boidinii* 706. Встановлено, що час відгуку кондуктометричного дріжджового сенсора досягає стаціонарного стану через 3 - 5 хв, а лінійність (у логарифмічному масштабі) спостерігається у межах 5 - 100 мМ. Показано, що залежності сигналу кондуктометричного біосенсора на основі клітин *C. boidinii* 706 від величини рН та буферної ємності аналізованого розчину аналогічні таким, що спостерігаються для метанольного біосенсора на основі рН-ПТ.

Результати визначення концентрації етанолу у реальних рідинах (горілка, коньяк, пиво та харчовий спирт), отримані за допомогою кондуктометричного сенсора на основі клітин *C. boidinii*

та методу газо-рідинної хроматографії представлено на рис. 6. Встановлено хороший рівень кореляції даних, отриманих за допомогою клітинного біосенсора, з результатами, визначеними референтним методом. Коефіцієнт кореляції складає 0,9988.

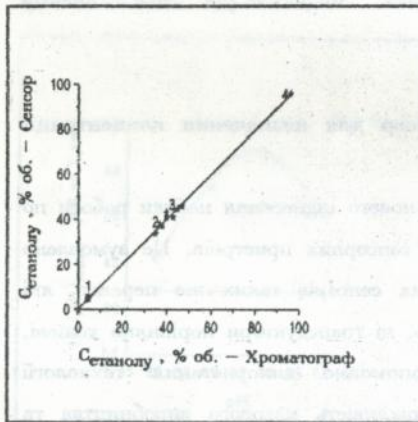


Рис. 6. Результати визначення концентрації спирту у алкогольних напоях (1 - пиво; 2 - горілка; 3 - коньяк та 4 - харчовий спирт), отримані за допомогою кондуктометричного клітинного біосенсора та методу газо-рідинної хроматографії. Коефіцієнти розведення зразків складають 250 разів для горілки та коньяку, 500 разів для спирту та 25 разів для пива.

Як і очікувалось, операційна стабільність сконструйованої системи була значно більшою і складала 5 годин (15 повторних визначень із інтервалом 30 хв), а стандартне відхилення величин сигналу біосенсора у даному випадку не перевищувало 10 %. Було також протестовано стабільність відгуку кондуктометричного біосенсора за зберігання. Коли біомембрана сенсора експлуатувалась щоденно протягом 2-х годин та зберігалась у 20 мМ водному розчині CaCl_2 за температури 20-25°C, сигнал був стабільним протягом 3-х днів. Проте, при зберіганні робочих елементів сенсорів при 4°C кондуктометричний сигнал був стабільним протягом 12 днів.

Формальдегідний аналізатор на основі рН-ПТ.

Для розробки високочутливого методу аналізу концентрації формальдегіду було застосовано клітини мутанта метилотрофних

дріжджів *Hansenula polymorpha* A3-11 із порушеним синтезом алкогольоксидази, формальдегідредуктази та форміатдегідрогенази, який індукується іонами форміату.

Характерна крива відгуку мікробного сенсора після внесення формальдегіду має такий же ж вигляд, як і у випадку вищеписаних сенсорів, специфічних до метанолу чи етанолу на основі рН-ПТ. Проте сигнал наростає значно швидше і досягає стаціонарного стану через 3-5 хв. Можливо, більша швидкість відгуку формальдегідного сенсора (5-6 кратна у порівнянні з описаними вище системами для аналізу спиртів на основі рН-ПТ) можна пояснити більшою швидкістю закислення, індукованого формальдегідом, що в свою чергу, можливо, зумовлено тим, що утворення НСООН із НСНО відбувається за один, а із $\text{СН}_3\text{ОН}$ - за два етапи окислення. Показано, що швидкість зміни потенціометричного відгуку (dU/dt) лінійно зростає із збільшенням концентрації клітин у гелі і описується рівнянням: $(dU/dt)_{\text{макс}} (\text{мВ/хв}) = 1,05C_{\text{клітин}} (\text{мг/мл}) + 0,35 (\text{мВ/хв})$ із коефіцієнтом кореляції 0,999 (в межах концентрації клітин до 25 мг/мл).

Мінімальна концентрація формальдегіду, яку можна визначити, складає 0,5 мМ, а лінійний діапазон вимірювань знаходиться у межах 2-200 мМ (рис. 7).

Збільшення буферної ємності розчину призводить до драматичного падіння амплітуди потенціометричного сигналу. Залежність відгуку сенсора від величини рН має вигляд сигмоїдної кривої з максимумом при рН від 7,0 і вище. Це може бути пов'язано із зміною властивостей гелю-носія при різних значеннях рН і їх впливом на дифузію продуктів. Адаже альгінат - полімер, який містить карбоксильні групи, здатні зв'язувати H^+ у кислій області рН і, таким чином, сповільнювати їх дифузію в рН-чутливий шар сенсора. З другого боку, відмінність рН-залежності

формальдегідного сенсора (від метанольного та етанольного сенсорів), можливо, пов'язана з особливою реакційною здатністю формальдегіду у порівнянні із спиртами.

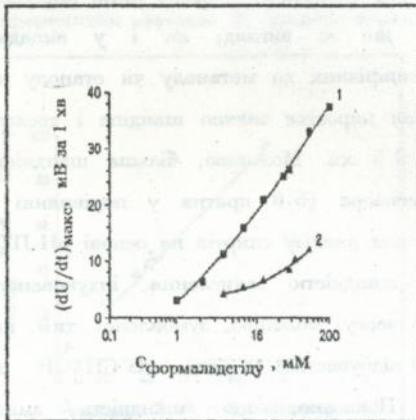


Рис. 7. Залежність швидкості зростання відгуку формальдегідного біосенсора від концентрації формальдегіду. Умови: дистильована вода (1) або "полімікс" буфер (2, буферна ємність 1 мМ/рН, рН 7,0); концентрація клітин у гелі 14 чи 10 мг сухої маси клітин у 1 мл відповідно.

Збільшення температури від 20°C до 55°C приводить до 4-х кратного зростання відгуку мікробного сенсора. Подальше зростання температури до 70°C приводить до різкого зменшення величини потенціометричного відгуку до 0. Таке критичне падіння величини сигналу зумовлено як температурною інактивациєю дріжджових клітин, так і деструкцією самого Са-алюмінатного гелю.

Досліджена залежність величини відгуку мікробного сенсора від кратності його застосування. Проміжок часу між вимірюваннями не перевищував 20 хв. Операційна стабільність за таких умов складає не менше 4-х годин, а стандартне відхилення величин відгуку не перевищує 1-3%. У той же ж час стандартне відхилення величин потенціометричних сигналів для мембран, які були сформовані на поверхні перетворювача *de novo*, складає близько 10%.

Встановлено, що створений біосенсор специфічно реагує на формальдегід (100%) та етанол (20%), не відповідаючи при цьому на метанол, пропанол, бутанол, форміат, ацетат, лактат, глюкозу.

Відгук до етанолу, можна пояснити скоріше всього ефектом так званої "розбалансованості" активностей ферментів обміну етанолу. На відміну від клітин дикого типу, вирощених на середовищі з глюкозою або етанолом, де максимально індукуються ферменти утилізації етанолу, і оцтова кислота повністю перетворюється у ацетил-SКоА, у нашому випадку, за можливості окислення етанолу алкогольдегідрогеназою і ацетальдегіддегідрогеназою до ацетату, подальша утилізація оцтової кислоти обмежена, внаслідок лімітування активності ацетил-SКоА синтетази, що підсилює екструзію CH_3COOH за присутності етанолу.

ВИСНОВКИ

1. Проведено скрінінг та підібрано мутантні штами метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* 34-19, *P. pinus* 2428 та *H. polymorpha* A3-11 із пошкодженим синтезом форміатдегідрогенази, ацетил-SКоА-синтетази та алкогольоксидази, формальдегідредуктази і форміатдегідрогенази відповідно, які характеризуються підвищеною здатністю до екструзії протонів.

2. Встановлено, що клітини метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* закислюють середовище інкубації за присутності формальдегіду. Формальдегід-індуковане закислення властиве клітинам, вирощеним на різних ростових субстратах (метанолі, етанолі, глюкозі чи гліцерині). Процес супряжений із нагромадженням форміату в інкубаційному середовищі, чутливий до азиду натрію, антимицину А та ортованадату.

3. Розроблено лабораторні моделі клітинних біосенсорів на основі мутантних клітин метилотрофних дріжджів та рН-чутливих польових транзисторів для роздільного визначення концентрації метанолу, етанолу та формальдегіду.

4. Вивчено робочі характеристики клітинних біосенсорів на основі рН-ПТ. Лінійна залежність між відгуком біосенсора і логарифмом концентрації аналіту спостерігається у межах 5-100 мМ для спиртів та 2-200 мМ для формальдегіду. Межа чутливості всіх систем складає 0,5 мМ відповідного аналіту. Встановлено, що підвищення буферної ємності зразку призводить до драматичного падіння величини сенсорного сигналу.

5. Розроблено лабораторну модель сенсора для визначення концентрації етанолу на основі клітин метилотрофних дріжджів *S. boidinii* 706 та кондуктометричних планарних електродів. Аналітичні параметри даної системи співпадають із такими на основі рН-ПТ. Показано, що сконструйований сенсор може успішно застосовуватися для визначення концентрації етилового спирту у деяких алкогольних напоях – пиві, горілці, коньяку та харчовому спирті.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Гончар М.В., Корпан Я.І., Сибірний А.А. Кількісний фотометричний аналіз етанолу з використанням очищеної алкогольоксидази та мутантних клітин метилотрофних дріжджів // Укр. біохім. журн.— 1991.— 63, №6.—С. 62-67.
2. Корпан Я.И., Гончар М.В., Солдаткин А.П., Стародуб Н.Ф., Сандровский А.К., Сибирный А.А., Ельская А.В. Клеточные микробиосенсоры на основе рН-чувствительных полевых транзисторов для определения метанола и этанола // Укр. биохим. журн.—1992.—64, №3.—С. 96-100.
3. Gonchar M.V., Korpan Y.I., Starodub N.F., Sibirny A.A. Formaldehyde-induced acidification of the medium by methylotrophic yeast cells and elaboration of cell biosensor based on this phenomenon

// Proc. of 3^d Int. conf. on Role of Formaldehyde in Biological Systems.-Sopron, Hungary.-1992.-P. 203-208.

4. Korpan Y.I., Gonchar M.V., Soldatkin A.P., Starodub N.F., Shul'ga A.A., Sibirny A.A., El'skaya A.V. Methylotrophic yeast microbiosensor based on ion-sensitive field effect transistors for methanol and ethanol determination // Anal. Chim. Acta.-1993.-271.-P. 203-208.

5. Korpan Y.I., Gonchar M.V., Starodub N.F., Shul'ga A.A., Sibirny A.A., El'skaya A.V. A cell biosensor specific for formaldehyde based on pH-sensitive transistors coupled to methylotrophic yeast cells with genetically adjusted metabolism // Anal. Biochem.-1993.-215, №2.-P. 216-222

6. Korpan Y.I., Dzyadevich S.V., Zharova V.P., El'skaya A.V. Conductometric biosensor for ethanol detection based on whole yeast cells // Ukrainian Biochem. Journal.-1994.- 66, V.1.-P. 82-86.

7. Корпан Я.И., Гончар М.В., Стародуб Н.Ф., Сибирный А.А., Ельская А.В. Клетки метилотрофных дрожжей как биологически активный материал для создания сенсорных устройств. Формальдегидный анализатор на основе pH-чувствительных полевых транзисторов // Биохимия.-1994.-59, №2.-С. 201-205.

8. Гончар М.В., Сибирный А.А., Корпан Я.И., Стародуб Н.Ф., Ельская А.В. Формальдегид-индуцируемое закисление среды и его биохимическая природа // Укр. биохим. журн.-1994.-66, №5-С.

Korpan Ya.I. Development of biosensors specific for methanol, ethanol and formaldehyde based on methylotrophic yeast cells.

Dissertation for a degree of Candidate of Biological Sciences, specialization 03.00.23 - biotechnology, Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1994.

The thesis contains the results on elaboration of laboratory prototype of highly-selective cell-based biosensors for methanol, ethanol and formaldehyde determination. The influence of sample buffer capacity, pH and cell content in biomembrane on the sensor response, as well as thermo-, working and storage stability, was investigated. It was established that the calibration curves were linear within the analyte concentration ranges from 5 to 100 mM for alcohols and 2 to 200 mM for formaldehyde.

Корпан Я.И. Разработка биосенсоров специфических к метанолу, этанолу и формальдегиду на основе клеток метилотрофных дрожжей.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.23 — биотехнология, Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев, 1994.

В диссертационной работе представлены результаты по разработке лабораторных макетов высокоселективных биосенсорных клеточных систем для определения концентрации метанола, этанола и формальдегида. Исследована зависимость величины сигнала сенсора от буферной емкости раствора, pH и концентрации клеток в биомембране, а также термостабильность, операционная стабильность и стабильность при хранении. Установлено, что линейная зависимость между откликом биосенсора и концентрацией аналита наблюдается в пределах 5 — 100 мМ для спиртов и 2 — 200 мМ для формальдегида.

Ключові слова: біосенсори, метанол, етанол, формальдегід, pH-чутливі польові транзистори, планарні електроди, мутанти.

Я. Корпан

Підписано до друку 10.11.94р Формат 60x84/16
Папір друк. Умов. друк.л. 1,0. Тираж 100 примірник. Заказ №1621
Надруковано ЦУОП ДНПІ "Плодвіниконсерв" м. Київ , Саксаганського ,1

AB 31.268

AB 31.268