

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В.ПАЛЛАДИНА

---

На правах рукопису

**ДЗЯДЕВИЧ**  
**Сергій Вікторович**

**РОЗРОБКА ФЕРМЕНТНИХ ТА КЛІТИННИХ КОНДУКТОМЕТРИЧНИХ  
БІОСЕНСОРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ ДЕЯКИХ  
СУБСТРАТІВ ТА ІНГІБІТОРІВ ФЕРМЕНТІВ**

03. 00. 23 - біотехнологія

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

КИЇВ - 1995



00778485 (\$)

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у секторі біоелектронної радіофізичного факультету Київського університету ім.Тараса Шевченка та відділі механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології та генетики НАН України (м.Київ).

**Наукові керівники:**

доктор фіз.-мат. наук, професор  
СТРИХА Віталій Ілларіонович  
канд. біологічних наук, ст. н. співр.  
СОЛДАТКІН Олексій Петрович

**Офіційні опоненти:**

доктор хімічних наук, ст. н. співр.  
ШАПОВАЛ Галина Сергіївна  
доктор біологічних наук, професор  
ПІХАКАДЗЕ Георгій Олександрович

**Провідна організація:**

Інститут Здоров'я ім.Л.І.Медведя  
МОЗ України (м.Київ)

Захист дисертації відбудеться 20 лютого 1995 р. о 14 год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.07.01 в Інституті біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України за адресою: 252601, м.Київ, вул.Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту біохімії ім.О.В.Палладіна НАН України

Автореферат розісланий 18 січня 1995 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук

Кирсенко О.В.

ЛНБ ім. В. Стефаника  
АН України

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність проблеми.** Проблеми охорони навколишнього середовища, контролю біотехнологічних процесів, збільшення кількості клінічних тестів в медичній діагностиці потребує все більш широкого використання в практиці та наукових дослідженнях селективних, високочутливих, швидких та економічних методів аналізу. Разом з поліпшенням різних фізико-хімічних інструментальних методів (хроматографічні, радіохімічні, люмінесцентні та інші) широке застосування знаходять аналітичні пристрої з використанням в ролі чутливих елементів біологічного матеріалу (ферментів, клітин та інших) для пошуку та кількісного визначення різноманітних органічних та неорганічних сполук: метаболітів, мутагенів, онкогенів, іонів важких металів і т.д. Серед таких пристроїв особливу увагу приділяють приладам нового покоління - біосенсорам.

Великий інтерес, який проявляється до біосенсорів протягом останніх двадцяти років, зумовлений їх певними перевагами у порівнянні з традиційними методами та приладами біохімічного аналізу: відносній дешевизні та простоті використання при високій чутливості та специфічності і можливості роботи з забарвленими зразками.

Але серед великої кількості робіт по біосенсорам зовсім незначна увага приділяється кондуктометричним біосенсорам - приладам, що реєструють зміну провідності розчину в мембрані під час біохімічної реакції. На сьогоднішній день розробкою кондуктометричних мініатюрних біосенсорів займаються лише кілька наукових груп: Bilitewski (Брауншвейг, Німеччина), Lowe (Кембрідж, Англія) та наша група. Така невелика увага, мабуть, частково базується на недостатньо вивчених принципах, які лежать в основі їх роботи, тому що кондуктометричні біосенсиори мають ряд значних переваг у порівнянні з іншими типами датчиків. Це: відсутність технологічно складного електроду порівняння; використання при роботі змінної напруги малої амплітуди, що дозволяє уникнути фарадєвських процесів на електродах; відсутність світлочутливості; здатність до мініатюризації та до великого ступеню інтеграції при використанні недорогої тонкоплівчатої стандартної технології.

У зв'язку з цим вдалося актуальним вивчити можливість використання кондуктометричного методу вимірювань для реєстрації перебігу ферментативних процесів і дослідити можливість створення високоселективних ферментних та клітинних кондуктометричних біосенсорів.

**Мета та задачі дослідження.** Головною метою роботи була розробка кондуктометричних біосенсорів на основі вивчення взаємодії ферментів та клітин з субстратами та інгібіторами в різних умовах. Як біологічні об'єкти було вибрано ферменти уреаза, глюкозооксидаза, ацетилхолінестераза, бутирилхолінестераза та дикий штам метилотрофних дріжджів *Candida boidinii* 706.

Виходячи з мети роботи, були сформульовані наступні задачі:

1. Вивчити електрохімічні процеси в комірці з тонкоплівчатими кондуктометричними перетворювачами з метою їх найбільш ефективного використання в біосенсорах.

2. Розробити лабораторний макет уреазного кондуктометричного біосенсора для визначення рівню сечовини в сироватці крові на основі вивчення властивостей вільної та іммобілізованої уреаз.

3. Розробити лабораторний прототип ферментного кондуктометричного біосенсора для визначення рівню глюкози в сироватці крові та провести пошук шляхів поліпшення його аналітичних характеристик.

5. Розробити макет ферментного кондуктометричного біосенсора для визначення фосфорорганічних пестицидів в водних розчинах на основі вивчення взаємодії іммобілізованих ацетил- та бутирилхоліністераз з інгібіторами.

6. Вивчити можливість використання інтактних\* клітин метилотрофних дріжджів *Candida boidinii* 706 для створення лабораторного макету клітинного кондуктометричного біосенсора по визначенню концентрацій етанолу в алкогольних напоях.

**Наукова новизна роботи.** В роботі вперше проведено дослідження електрохімічних процесів в комірці з кондуктометричними перетворювачами з метою вибору оптимальних умов роботи з ферментними кондуктометричними біосенсорами. Показано, що робота на високих частотах змінного струму дає можливість знехтувати поверхневими ефектами на електродах та їх деградацією при зберіганні та дозволяє використовувати кондуктометричні тонкоплівчаті перетворювачі для створення біосенсорів.

Досліджено можливість використання кондуктометричного перетворювача для вивчення взаємодії вільної та іммобілізованої уреазы з сечовиною та розроблено лабораторний прототип уреазного кондуктометричного біосенсора. Приведено результати використання кондуктометричного біосенсора для визначення концентрації сечовини в крові і різнобічно досліджено його електрохімічні характеристики (залежність від рН, буферної ємності розчину та концентрації солі в розчині).

Вперше розроблено лабораторний прототип ферментного кондуктометричного біосенсора для визначення концентрації глюкози в крові. Досліджено вплив на відгук біосенсору параметрів середовища, таких як буферна ємність розчину та концентрація солі в буферному розчині. Приведено ряд шляхів розширення лінійного діапазону роботи глюкозного біосенсору та зменшення впливу на величину відгуку параметрів середовища. Показано, що використання додаткових заряджених мембран дозволяє розширити динамічний діапазон роботи датчика до 10 мМ глюкози без погіршення його чутливості та значно зменшити вплив на величину відгуку біосенсора буферної ємності розчину.

Вперше за допомогою кондуктометричного перетворювача проведено вивчення взаємодії холіністераз з інгібіторами та на цій основі розроблено макет ферментного кондуктометричного біосенсора для визначення фосфорорганічних пестицидів у водних розчинах. Досліджено чутливість такого сенсору до ряду пестицидів (діізопропілфторфосфат, параоксон-етил, параоксон-метил, трихлорфон), показано можливість відновлення активності іммобілізованого ферменту після дії на нього інгібіторів.

Вперше розроблено лабораторну модель кондуктометричного клітинного біосенсора для визначення концентрації етанолу в деяких алкогольних напоях на основі інтактних клітин метилотрофних дріжджів *Candida boidinii* 706 з хорошим рівнем кореляції даних, отриманих за його допомогою, з результатами, визначеними методом газо-рідинної хроматографії.

**Практична цінність роботи.** Створено діючі лабораторні моделі ферментних кондуктометричних біосенсорів для експресного визначення концентрацій

сечовини та глюкози в сироватці крові. Наведені характеристики вказують на перспективність таких біосенсорів. Вони можуть бути основою при розробці та налагодженні промислового випуску вимірювальних приладів для біохімічної діагностики.

Створено діючу лабораторну модель ферментного кондуктометричного біосенсора для визначення концентрацій фосфорорганічних пестицидів в водних розчинах, яка може бути основою при розробці приладів контролю забруднення при проведенні моніторингу навколишнього середовища.

Створено діючу лабораторну модель клітинного кондуктометричного біосенсора для визначення концентрацій етанолу в алкогольних напоях. Датчик може з успіхом використовуватись в харчовій промисловості при виробництві алкогольних напоїв, а також на станціях швидкої допомоги та в судмедекспертизі для експресного визначення рівню етанолу в крові.

Апробація роботи. Результати досліджень доповідались на Республіканській науково-технічній конференції "Новые возможности современного биомедицинского приборостроения" (Ворзель, Україна, 1991), на Другому світовому конгресі "Biosensors '92" (Женева, Швейцарія, 1992), на Міжнародній конференції "Journées d'Electrochimie" (Гренобль, Франція, 1993), на Міжнародній конференції "Electrodes-modifiées electrocatalyse et capteurs electrochimiques" (Париж, Франція, 1993), на Міжнародній конференції "Evrosensors VII" (Будапешт, Угорщина, 1993), на Міжнародній конференції по хімічним сенсорам (Рим, Італія, 1994), на Міжнародній конференції "Evrosensors VIII" (Тулуза, Франція, 1994).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 12 журнальних статей.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів дослідження, експериментальної частини, яка включає виклад результатів роботи та їх обговорення (у 5 главах), висновків, а також списку літератури, який включає 119 публікацій.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі використовували наступні реактиви: уреазу марки Б з бобів сої (КФ 3.5.1.5, виробництво Олайнського заводу хіміреактивів, Литва) з активністю 12 од.акт./мг.;  $\beta$ -глюкозооксидаза (ГОД) з *Penicillium vitale* (КФ 1.1.3.4, виробництво Косарського спиртзаводу Черкаського виробничого об'єднання спиртової промисловості) з активністю 168 од.акт./мг.; бутирилхолінестераза (БУХЕ) з сироватки крові коня (КФ 3.1.1.8, виробництво фірми "Sigma", Франція) з активністю 266 од.акт./мг.; ацетилхолінестераза (АХЕ) з електричного органу вугря (КФ 3.1.1.7, виробництво фірми "Sigma", Франція) з активністю 225 од.акт./мг.; каталаза з печінки бика (КФ 1.11.1.6, виробництво фірми "Sigma", Франція) з активністю 19.9 од.акт./мг.; сироватковий альбумін бика (БСА) фірми "Boehringer Mannheim" (Франція); 25 % розчин глютарового альдегіду (ГА) фірми "Serva" (Германія). Субстрати глюкоза, сечовина, ацетилхолін хлорид та бутирилхолін хлорид були виробництва фірми "Sigma" (Франція). Фосфорорганічні пестициди діізопропілфторфосфат ДФФ), діетил-р-нітрофенол фосфат (етил-параоксон), трихлорфон та реактиватор холінестераз піридин-2-альдоксим метиловид (ПІАМ) були фірми "Sigma" (Франція), метил-параоксон - фірми "Riedel-de-Haen" (Швейцарія). Матеріали для додаткових мембран: полівінілбутирол (ПВБ) був

отриманий лінійною сополімеризацією вінілбутиролу, вінілалкоголю та вінілацетату у пропорціях 75:22:3, "NAFION-perfluorinated" (5 % в суміші низько-аліфатичних спиртів та 10 % води, продукт № 27.470-4) був поставлений фірмою "Aldrich Chem.Co.". Дріжджовий екстракт був поставлений фірмою "Difco Laboratories" (США), альгінат натрію - фірмою "Chemical Co. Ltd." (Англія). Як буферні розчини використовували калій-фосфатний буфер ( $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ ) фірми "Merck", тріс фірми "Reanal" (Угорщина), НЕРЕС фірми "Calbiochem" (США). Інші реактиви, що використовувались в роботі, були вітчизняного та закордонного виробництва та мали кваліфікацію "ос. ч." та "х. ч."

Клітини штаму вирощували в середовищі, яке складалося з таких компонентів: 1.0 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3.5 г/л  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.3 г/л  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.1 г/л  $\text{CaCl}_2$  та 0.5 г/л дріжджового екстракту "Difco". В якості джерела вуглероду використовували 1 % етанол. Дріжджові клітини вирощували до експоненціальної фази росту при постійному перемішуванні (240 об/хв) за температурою 30 °С. Концентрацію клітин визначали оптичним методом [Гончар и др., 1990]. Перед експериментом дріжджі осаджували центрифугуванням при 5 тис об/хв та декілька разів промивали дистильованою водою.

Дослідження проводили на перетворювачах власного виробництва. Вони представляли з себе непровідну підкладку, на якій методом вакуумного напilenня було отримано дві пари гребінчатих тонкоплівчатих металевих електродів.

Для створення ферментної біоматриці готували розчини ферменту та БСА в 20 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7.4 з кінцевими концентраціями 50 мг/мл та змішували в співвідношенні 1:1 відповідно. В суміш фермент-БСА добавляли гліцерин до кінцевої концентрації 10 % для стабілізації ферменту при іммобілізації та щоб запобігти передчасному підсиханню розчину, нанесеного на поверхню перетворювача. Краплю суміші фермент-БСА наносили на поверхню однієї пари електродів. На поверхню другої пари наносили розчин одного БСА (ця пара була датчиком порівняння). Для полімеризації мембран датчики поміщали в атмосферу насичених парів ГА на 30 хв і потім підсушували на повітрі [Shul'ga et al, 1993]. Всі додаткові мембрани формувалися поверх як ферментної, так і референтної мембран крапельним засобом. Для білкової матриці брали 10 % розчин БСА, наносили суцільним шаром поверх мембран і потім полімеризували в атмосфері насичених парів ГА на протязі 30 хвил. ПVB-матриця формувалася нанесенням краплі 5 % розчину полімеру в етанолі з подальшим підсушуванням її на повітрі. Для NAFION-матриці брали 5 мкл NAFION-розчину, наносили поверх мембран та центрифугували на протязі 1-2 хвилин. Після цього мембрани підсушували на повітрі [Soldatkin et al, 1994].

Клітинні біомембрани формували нанесенням на поверхню однієї пари електродів 1 мкл суміші 2 % розчину альгінату натрію з 5-20 мкг дріжджових клітин. На поверхню другої пари електродів наносилося 1 мкл 2 % розчину альгінату натрію і цей електрод був елементом порівняння. Потім датчик поміщали в 0.1 М  $\text{CaCl}_2$  на 2 хвил до утворення гелю [Korpan et al, 1994].

Вимірювання проводились в різних буферних розчинах при кімнатній температурі в відкритому об'ємі з інтенсивним перемішуванням. Перед роботою перетворювачі вимочували деякий час в буферному розчині до отримання стабільного сигналу. Концентрації субстратів змінювали шляхом добавлення певних аліквот концентрованих розчинів.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

ВИВЧЕННЯ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ ПРОЦЕСІВ В КОМІРЦІ З  
ТОНКОПЛІВЧАТИМИ КОНДУКТОМЕТРИЧНИМИ ПЕРЕТВОРЮВАЧАМИ

Тонкоплівчатий кондуктометричний перетворювач - це мініатюрний двохелектродний пристрій для вимірювань провідності тонкого шару розчину, який знаходиться безпосередньо біля поверхні електродів. В комплексі з біологічно активною мембраною він перетворюється в біосенсор. Схематично він представлений на рис.1а.

Ключем до вивчення системи тонкоплівчатий перетворювач в розчині є уявлення фізико-хімічних процесів, які в ній проходять, у вигляді еквівалентного електричного ланцюга, в якому ці процеси замінюються відповідними електронними елементами, а саме конденсаторами та резисторами. Фізико-хімічні процеси, що протікають в електрохімічній комірці, запропоновано змодельювати слідуючою еквівалентною схемою (рис.1б), де  $C_{плш}$ ,  $R_{пл}$ ,  $C_{окисл}$ ,  $R_{розч}$  - ємність подвійного шару, опір перетину, ємність окислу та опір розчину відповідно.

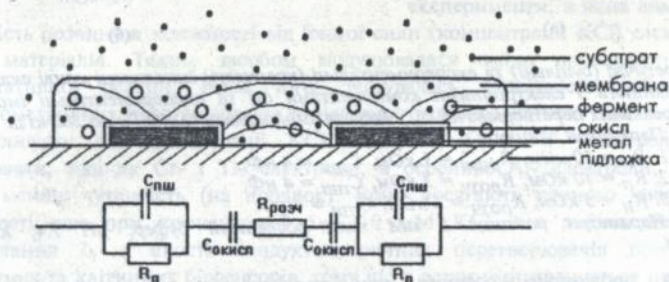
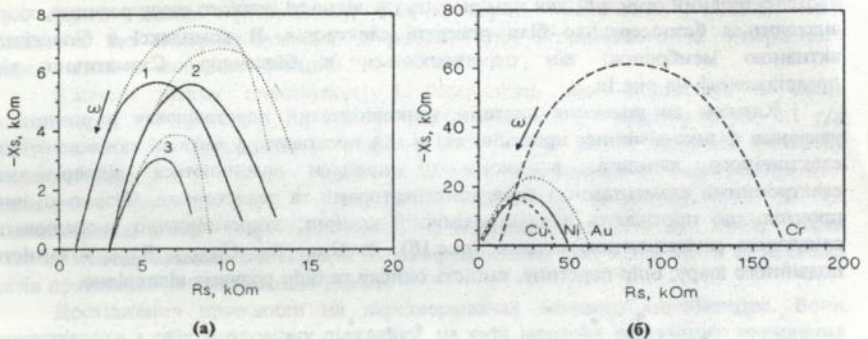


Рис. 1. Кондуктометрична комірка та її еквівалентна схема

Для аналізу властивостей такої системи використовувався досить новий метод дослідження електрохімічних процесів - імпедансна спектроскопія, при якому аналізуються залежності реактивної складової повного опору системи (імпедансу) від активної для різних частот змінного струму. Було проведено теоретичний розрахунок еквівалентної схеми, побудовані відповідні теоретичні імпедансні криві (рис.2.а). Для підтвердження правильності запропонованої та розрахованої моделі електрохімічного імпедансу кондуктометричної комірки, замість тонкоплівчатих перетворювачів в вимірювальну схему було підключено еквівалентний ланцюг з електронними елементами. Експериментальні імпедансні криві, які були отримані для еквівалентного ланцюга, добре корелюють з теоретичними (рис.2.а) та відповідають імпедансним кривим, отриманим для реальних перетворювачів (рис.2.б), що підтверджує правильність вибору еквівалентної схеми.

Принцип роботи ферментного кондуктометричного біосенсора базується на тому, що під час ферментативної реакції проходить зміна провідності (опору) розчину в приелектродній області мембрани, що пропорційна концентрації певної речовини в розчині. Таким чином основним інформативним параметром системи є

зміна  $R_{розч}$ . Було досліджено зміну експериментальних імпедансних кривих при зміні різних компонент еквівалентного ланцюга, підключеного до схеми вимірювань. На рис. 2 а показано, що зміна величини  $R_{розч}$  значно більше впливає на реальну складову імпедансу, чим інші елементи еквівалентного ланцюга, особливо на високих частотах, що дуже важливо при роботі з ферментним кондуктометричним біосенсором.



**Рис. 2.** Теоретичні (суцільні) та експериментальні (крапчасті) імпедансні криві еквівалентного ланцюга з електронними компонентами (а) та експериментальні імпедансні криві реальних перетворювачів (б). Частота змінювалась зі 100 Гц до 200 кГц.

(а): Параметри ланцюга:

1.  $R_{п} = 10 \text{ кОм}$ ,  $R_{розч} = 1 \text{ кОм}$ ,  $C_{пш} = 4 \text{ нФ}$ ,
2.  $R_{п} = 10 \text{ кОм}$ ,  $R_{розч} = 3 \text{ кОм}$ ,  $C_{пш} = 4 \text{ нФ}$ ,
3.  $R_{п} = 5 \text{ кОм}$ ,  $R_{розч} = 3 \text{ кОм}$ ,  $C_{пш} = 4 \text{ нФ}$ ,

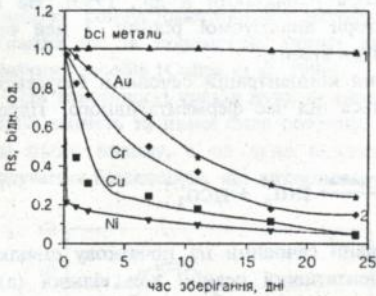
(б): Параметри розчину: 5 мМ калій-фосфатний буфер, рН 7.4, кімнатна температура.

Зміна провідності розчину при дослідженні модулювалась зміною концентрації КСІ в розчині та температурою. Показано, що зміна фонові провідності розчину головним чином впливає на високочастотну частину імпедансу. Таким чином, працюючи на високій частоті, ми маємо кращу чутливість датчика. До того ж, при таких умовах експерименту, основний вклад до сигналу дає реальна компонента, тобто провідність, що й потрібно для кондуктометричних біосенсорів.

При роботі з кондуктометричними датчиками було відмічено, що при довгостроковій експозиції в розчині, їх характеристики суттєво змінювались. Для дослідження природи цього феномену було проведено спеціальну серію досліджень, коли структури, які тестувались, занурювались в розчин та періодично аналізувались їх імпедансні залежності.

З рис.3 видно, що при роботі на високих частотах, величина реальної складової імпедансу з часом зберігання майже не змінюється і ми вимірюємо лише  $R_{розч}$ , в той час як на низьких частотах реальна складова імпедансу зменшується в 3 - 10 разів в залежності від матеріалу електродів.

На основі вимірювань з реальними електродами та експериментів з еквівалентною схемою слідує, що електрохімічний імпеданс, поміряний на високій частоті, не чутливий до зміни поверхневого імпедансу електродів, а визначається



**Рис. 3.** Залежність реальної складової імпедансу для електродів з різних матеріалів від часу зберігання їх в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7.4. Вимірювання проводились на частотах 100 кГц (1) та 200 Гц (2).

провідність розчину в залежності від іонної сили (концентрації КСІ) електродами з різних матеріалів. Таким засобом модулювалася зміна провідності під час ферментативної реакції. Крім того, тестувалась можливість роботи різних кондуктометричних перетворювачів в рідинах з великою іонною силою. Показано, що чутливість до концентрації КСІ для Au-, Cu-, Ni- електродів можна порівнювати, тоді як Cr- і Ti- електроди, а особливо Al- електроди, показують значно меншу чутливість (на порядок). Вони досягають повного насичення по провідності вже при концентрації 5 - 10 мМ КСІ, що робить неможливим використання їх в якості кондуктометричних перетворювачів при розробці ферментних та клітинних біосенсорів, тому що з останніми планується працювати в біологічних рідинах, які як правило мають велику фонову провідність.

Подальша робота була сконцентрована на розробці кондуктометричних біосенсорів для медичної діагностики та моніторингу навколишнього середовища з застосуванням в ролі чутливого елемента різних за своєю природою біологічно активних матеріалів, а саме уреаз, глюкозооксидази, ацетилхолінестерази, бутирилхолінестераза та дикого штаму метилотрофних дріжджів *Candida boidinii* 706.

## РОЗРОБКА УРЕАЗНОГО КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА

Загальноприйняті лабораторні біохімічні методи визначення концентрацій сечовини в розчині та активності уреаз базуються на використанні або прямих кольорових реакцій, або спектрофотометричної індикації амонію, який утворюється при каталітичному розщепленні сечовини уреазою. Ці засоби включають складні та тонкі процедури, які потребують для їх відтворення значного часу. Крім того, використання ультрафіолетової спектрофотометрії досить лімітовано при вивченні кольорових розчинів, таких, наприклад, як кров.

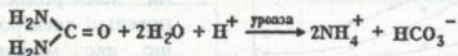
В даній главі для цієї мети пропонується використати кондуктометричний перетворювач. Попередні дослідження не дають повного уявлення о перспективах

головним чином об'ємними властивостями контактуючих фаз, а саме розчином між електродами. Тобто при вимірюваннях на частотах більш 50 кГц можна знехтувати поверхневими ефектами на електродах та деградацією поверхні електродів при зберіганні, що дає можливість створювати стабільні біосенсори, які мало залежать від деградації перетворювача.

Враховуючи ці результати для кондуктометричних вимірювань в подальших експериментах використовувалась частота змінного струму 100 кГц. Були проведені експерименти, в яких вимірювалася

практичного використання такого біосенсора [Солдаткин и др., 1993]. На його властивості значно впливають різні фактори аналізованої рідини, і цей вплив необхідно враховувати при розробці процедури аналізу.

Кондуктометричний метод визначення концентрацій сечовини базується на реєстрації заряджених іонів, які утворюються під час ферментативного гідролізу сечовини:



На рис. 4 показано вплив концентрації сечовини на початкову швидкість зміни провідності розчину під час ферментативної реакції для вільної (а) та іммобілізованої (б) уреази.

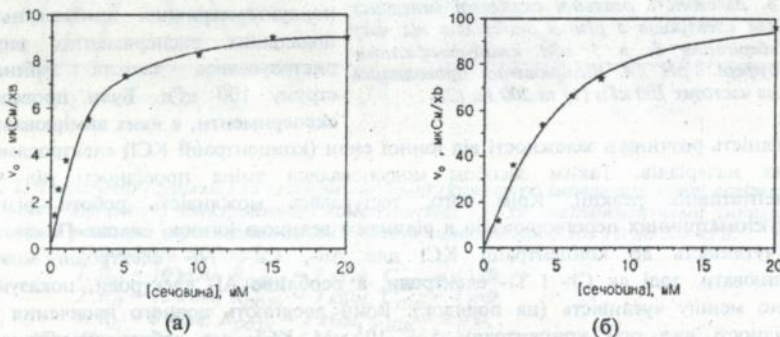


Рис. 4. Калібрувальна крива кондуктометричного біосенсора з вільною (а) та іммобілізованою (б) уреазою для визначення сечовини в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7.4.

Експериментальні результати були перебудовані в криві Іді-Хофсті, що дозволило визначити значення  $K_M = 1.33$  мМ з коефіцієнтом кореляції  $R = 0.99$ .

Кінетичні закономірності іммобілізованих ферментів також підчиняються рівнянню Міхаеліса-Ментен з тією лише різницею, що замість  $K_M$  буде визначатись ефективне (уявне) значення константи Міхаеліса  $K_{M(\text{уяв})}$ . Це відбувається тому, що концентрація субстрату поблизу ферменту (локальна) може відрізнятись від концентрації субстрату у всьому об'ємі системи.  $K_{M(\text{уяв})}$  в цьому випадку повинна залежати від розподілу субстрату між вільним розчином та ферментною мембраною. Значення  $K_{M(\text{уяв})}$  було 3.73 мМ з коефіцієнтом кореляції  $R = 0.997$ . Таке збільшене значення  $K_{M(\text{уяв})}$  можна пояснити тим, що по-перше, при іммобілізації може відбуватися зміна спорідненості фермента до субстрату із-за конформаційних змін, а по-друге, ферментативний процес в мембрані може контролюватись дифузійними процесами, а саме внутрішньою дифузією продуктів та субстратів в ферментній мембрані. В випадку дифузійного лімітування практично весь субстрат, який проходить в мембрану, реагує та витрачається в приповерхневих шарах носія, а глибинні області його вже не мають, чи в мембрані виникає градієнт концентрацій субстрату та продукту і цей факт необхідно враховувати при аналізі

класичних рівнянь. Величина  $K_M$  для вільної та іммобілізованої урези, отримана за допомогою кондуктометричного методу, близька до величин, експериментально отриманих як за допомогою інших електрохімічних методів, так і класичних біохімічних засобів [Cullen et al, 1990].

На властивості урези дуже впливають різні фактори середовища, а саме рН, буферна ємність та іонна сила розчину. Іммобілізація ферменту може привести до зміни цього впливу, а це дуже важливо для оцінки можливостей практичного застосування біосенсорів, які використовують саме іммобілізовану форму фермента.

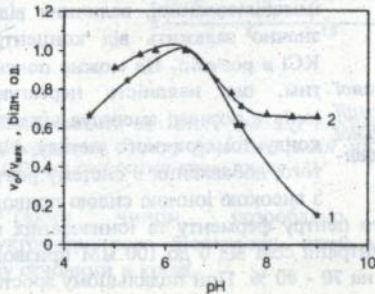


Рис. 5. Залежність швидкості ферментативної реакції гідролізу сечовини від рН середовища для вільної (1) та іммобілізованої (2) урези. Вимірювання проводились в 5 мМ калій-фосфатному буфері з різними рН, концентрація добавляемої сечовини - 5 мМ.

На рис.5 представлено криву залежності швидкості ферментативної реакції від рН середовища для вільної та іммобілізованої урези. Оптимум рН для вільної урези у 5 мМ калій-фосфатному буфері знаходиться близько 6.5. Він дещо зсунутий в кислу область у порівнянні з рН-оптимумом, отриманим фенол-гіпохлоритним біохімічним методом у 100 мМ калій-фосфатному буфері [Бубряк и др., 1993]. Такий ефект, можливо, пов'язаний з тим, що у розчинах з низькою буферною ємністю, в результаті накопичення іонів амонію, залужнення середовища копенсується не

повністю, тому фермент фактично функціонує при більш високих локальних значеннях рН, ніж рН буферного розчину, що використовується. При іммобілізації ферменту в мембрану, рН-оптимум для урези розширюється. Внаслідок цього швидкість ферментативної реакції стає менш чутливою до зміни рН, особливо в області рН 7.4, що дуже важливо для експериментів з біологічними рідинami. Подібний ефект може бути пояснений лімітуванням дифузії субстрату в мембрані.

Як правило біологічні рідини мають високу буферну ємність, тому було проведено експерименти по вивченню впливу буферної ємності середовища на кінетичний відгук уреазного біосенсора. На рис.6 наведено залежність початкової швидкості ферментативної реакції для вільної та іммобілізованої урези від буферної ємності середовища при рН калій-фосфатного буферу 7.4. Видно, що для вільної урези при зростанні концентрації буферу до 5 мМ, швидкість реакції зменшується в 2 рази, при дальшому збільшенні буферної ємності, вона зменшується незначно. Цей ефект пов'язаний з тим, що в випадку вільної урези іони, що утворюються під час реакції, не зв'язуються складовими частинами буферу при низькій буферній ємності, звідси й значна зміна провідності розчину. Для буферу з великою буферною ємністю, частина іонів, які утворилися, зв'язується частинками буферу, тобто залужнення середовища частково копенсується, в результаті проходить незначна зміна провідності розчину. Для іммобілізованої урези на цей ефект накладається дифузійне лімітування, що приводить до того, що швидкість реакції майже не залежить від буферної ємності реакційного середовища.

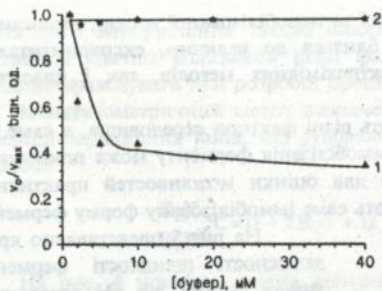


Рис. 6. Залежність швидкості ферментативної реакції гідролізу сечовини від концентрації калій-фосфатного буферу, рН 7.4 для вільної (1) та імобілізованої (2) уреаз. Концентрація добавляємої сечовини - 0.5 мМ.

до екранування заряджених груп активного центру ферменту та іонизованих груп розчину. Виявилось, що підвищення концентрації солі від 0 до 100 мМ призводить до зниження величини сигналу приблизно на 70 - 80 %. При подальшому зростанні концентрації солі до 400 мМ величина відгуку змінювалась незначно. Таким чином, для усунення впливу іонної сили середовища, при визначенні рівню сечовини в біологічних рідинах необхідно у вихідний буфер додавати КСІ в концентрації 100 мМ.

Із наведених результатів можна зробити висновок, що за допомогою кондуктометричного уреазного біосенсора можна з успіхом проводити визначення концентрації сечовини в біологічних рідинах. Згідно даних по складу крові, концентрація сечовини в ній може змінюватись від 6 - 8 мМ в нормі до 40 мМ та більше при патології [Хмелевський, 1988]. Оскільки робочий діапазон біосенсора є меншим, пробу крові треба розводити. При розбавленні цільної рідини в 20 разів отримують діапазон зміни концентрацій сечовини в розчині, який співпадає з робочою областю кондуктометричного уреазного біосенсору (0.1 - 2 мМ сечовини). Це забезпечує найбільш точні результати вимірювань.

На рис.7 наведено результати експериментів з сироваткою крові кроля. Спочатку в комірку об'ємом 2 мл два рази підряд добавлялася сечовина до кінцевої концентрації 0.2 мМ. В результаті отримувались відгуки біосенсора на відому концентрацію субстрата, що дозволяло збудувати лінійний участок калібрувальної кривої сенсора. Потім в комірку добавлялася цільна сироватка крові порціями по 100 мкл, що приводило до її 20-кратного розведення. В результаті такої внутрішньої калібровки та в припущенні лінійної залежності сигналу біосенсора від концентрації сечовини в даному діапазоні концентрацій отримали, що концентрація сечовини в розведеній крові складала 0.2 мМ, що відповідає 4 мМ сечовини в цільній крові.

Для біологічних рідин характерними є високі концентрації різних солей, тому вивчення залежності величини кінетичного відгуку біосенсора від іонної сили середовища є досить важливим для розробки уреазного біосенсора. Було показано, що як для вільної уреаз, так і для імобілізованої, величина відгуку значно залежить від концентрації КСІ в розчині. Це можна пояснити тим, що наявність нереагуючих іонів в розчині зменшує чутливість кондуктометричного методу, і крім того, добавлення в систему розчину з високою іонною силою приводить

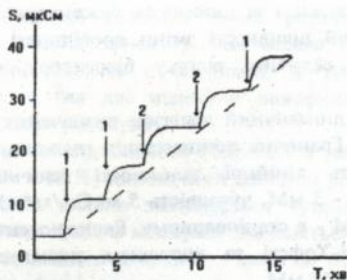


Рис. 7. Залежність вихідного сигналу біосенсора від часу при добавленні до 5 мМ калій-фосфатного буферу (рН 7,4), який містить 150 мМ КСІ, 0,2 мМ сечовини (1) та 100 мкл сироватки крові кроля (2).

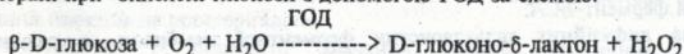
Таким чином, розроблено лабораторний прототип уреазного кондуктометричного біосенсора, який можна використовувати для визначення складу сечовини в крові.

#### РОЗРОБКА ГЛЮКОЗНОГО КОНДУКТOMETРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ТА ПОШУК МОЖЛИВОСТЕЙ ПОЛІПШЕННЯ ЙОГО АНАЛІТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК

Серед великої кількості біосенсорів домінуюче положення займають датчики на глюкозу, тому що глюкоза є одним з головних метаболітів, який визначається в біологічних середовищах. На даний час відома велика кількість біосенсорів для визначення глюкози, але комерційних приладів на їх основі створено мало [Hall, 1990].

Широке застосування глюкозних біосенсорів на практиці лімітовано рядом їх недоліків. В деяких випадках це недостатньо висока чутливість та стабільність сенсору, а частіше за все - вузький динамічний діапазон концентрацій, що визначаються. Також характеристики відомих біосенсорів дуже залежать від іонної сили, буферної ємності та рН середовища, що завжди необхідно враховувати при розробці процедури аналізу. Для усунення цих недоліків необхідно перш за все вивчити властивості іммобілізованої глюкозооксидази, які лежать в основі роботи ферментних біосенсорів на глюкозу.

В основі роботи кондуктометричного біосенсора для визначення глюкози лежить реєстрація зміни провідності розчину в мембрані за рахунок зміни концентрації протонів в результаті диссоціації глюконової кислоти, яка утворюється в мембрані при окисленні глюкози з допомогою ГОД за схемою:



I  
глюконова кислота

II  
залишок глюконової кислоти + H<sup>+</sup>

Визначення концентрації глюкози за допомогою біосенсора можна проводити двома засобами: по максимальній швидкості зміни провідності розчину під час ферментативної реакції та по величині відгуку біосенсора, коли в системі встановлюється рівновага.

Як можна бачити з рис.9 динамічний діапазон визначення глюкози в обох випадках практично однаковий. Гранична концентрація глюкози, що визначалася біосенсором, 0,01 мМ, область лінійної залежності величини відгуку від концентрації субстрату була до 2 - 3 мМ, чутливість 5 мкСм/хв\*мМ в кінетичному режимі визначення та 8 мкСм/мМ - в стаціонарному. Експериментальні результати були перебудовані в криву Іді-Хофсті та визначене значення  $K_m(\text{уяв})$  для іммобілізованої ГОД, яке склало 1.57 мМ.

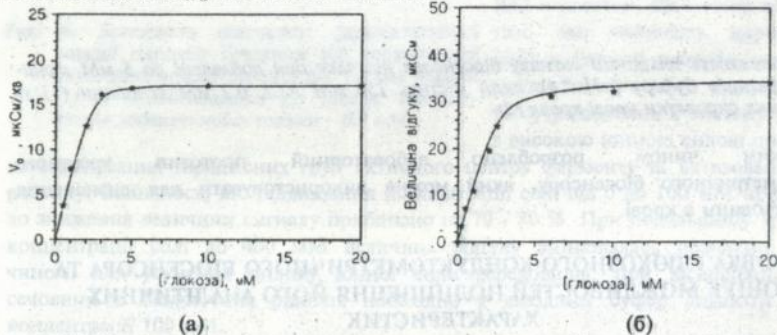


Рис. 9. Калібрувальні криві кондуктометричного глюкозного біосенсору в кінетичному (а) та стаціонарному (б) режимах вимірювань. Вимірювання проводились в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7.4

Лінійність калібрувальної кривої кондуктометричного біосенсора зберігалась до 2 - 3 мМ глюкози. При більш високих концентраціях глюкози спостерігається насичення. Але концентрація глюкози в крові змінюється від 3 - 5 мМ в нормі до 40 мМ при патології, що потребує розведення проби крові при її вимірюванні із-за вузького динамічного діапазону біосенсора. Тому пошук шляхів розширення динамічного діапазону біосенсора є досить важливим для розробки експресного датчика на глюкозу..

Такий вузький діапазон може бути пояснений лімітуванням ферментативної реакції гідролізу киснем, який є в ній косубстратом. Тому було запропоновано наступні шляхи розширення динамічного діапазону роботи глюкосенсора, а саме:

- 1). Збільшення концентрації кисню в зразках пробулькуванням останнього.
- 2). Коіммобілізація в ферментну мембрану додаткового ферменту каталази, яка розщеплює  $\text{H}_2\text{O}_2$  з виділенням кисню.
- 3). Зміна концентрації активного ферменту ГОД в мембрані шляхом зміни співвідношення фермент-БСА.
- 4). Зміна дифузійних характеристик ферментної мембрани за рахунок використання додаткових мембран різної природи.

При пробулькуванні киснем досліджуемого зразка верхня межа динамічного діапазону біосенсора як в кінетичному режимі вимірювань, так і в стаціонарному, зсувається в сторону більш високих концентрацій глюкози, а саме до 5 - 10 мМ.

При коімобілізації каталази ефект розширення динамічного діапазону досить незначний (рис.10, крива 3). Це можна пояснити тим, що каталаза не продукує додатковий кисень в мембрані, а тільки частково регенерує вже використаний раніше (на дві молекули використаного раніше кисню може регенуватись лише одна молекула).

При зменшенні співвідношення ГОД:БСА в мембрані від 9:1 до 1:9 (сумарна концентрація білка - 10 %) динамічний діапазон роботи сенсора розширюється до 5 мМ, однак, досить сильно зменшується чутливість сенсора. Це може бути пов'язано з наступним. Коли в мембрані знаходиться велика кількість ферменту, то вся глюкоза, яка проходить всередину, зразу ж реагує в приповерхневих шарах мембрани, і при великих концентраціях субстрату, кисню недостатньо. Тому і насичення по глюкозі відбувається вже при 2 мМ. Якщо зменшити кількість активного ферменту в мембрані, то в приповерхневих шарах мембрани в реакцію включається менша кількість глюкози, а відповідно і кисню. Тобто вони дифундують далі всередину мембрани і на швидкість ферментативної реакції вже починають впливати дифузійні процеси, що приводить до незначного розширення діапазону.

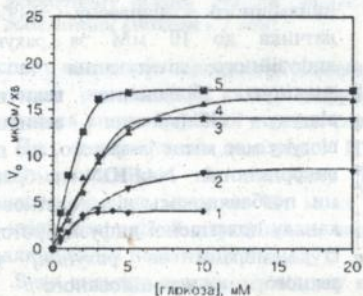


Рис. 10. Калібрувальні криві кондуктометричного глюкозного біосенсора в кінетичному режимі вимірювань для ГОД-мембрани (5), ГОД+каталаза-мембрани (3) та різних додаткових мембран: БСА (1), 5% ПВБ (2) та 2% ПВБ (4). Вимірювання проводились в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7.4.

відгуку (до 10 хв і вище). Використання же 2 % ПВБ-мембрани дозволяє розширити динамічний діапазон роботи датчика до 9 - 10 мМ з незначним зменшенням чутливості. При використанні більш щільної 5 % ПВБ-мембрани динамічний діапазон роботи сенсора ще трохи розширюється, але чутливість сенсора падає. Для сенсора з додатковою 10 % ПВБ-мембраною відгуків на додавання глюкози не спостерігалось.

В таблиці 1 приведені значення уявних кінетичних параметрів ферментативної реакції для іммобілізованої глюкозооксидази. Видно, що для розширення динамічного діапазону роботи кондуктометричного глюкозного біосенсора без погіршення його чутливості найбільш ефективно використання додаткової 2 % ПВБ-мембрани.

Значну увагу в подальшій роботі було сконцентровано на використанні різних додаткових мембран, які наносяться поверх ферментної мембрани для зміни її дифузійних властивостей. В цьому випадку створюється дифузійний бар'єр для проникнення в мембрану молекул глюкози, в той час як розчинений кисень має змогу вільно проходити всередину мембрани. В якості таких додаткових мембран використовували БСА та ПВБ (рис.10). Видно, що використання додаткової БСА-мембрани (крива 1) не приводить до збільшення діапазону роботи сенсора, а тільки значно зменшує величину відгуку та збільшує час

Таблиця 1. Уявні кинетичні параметри ферментативної реакції для іммобілізованої різними засобами глюкозооксидази.

Тип мембрани	ГОД	ГОД+каталаза	Дод. 2% ПВБ	Дод. 5% ПВБ	Дод. БСА
$K_M$ (уяв), мМ	1.57	3.1	4.2	5.4	1.4
Відгук, мкСМ/хв	20.5	16.4	21.3	11.3	5.0

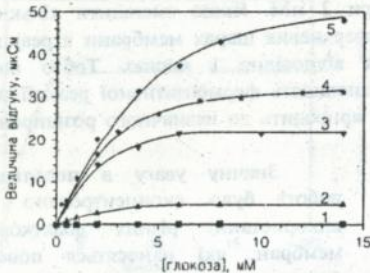
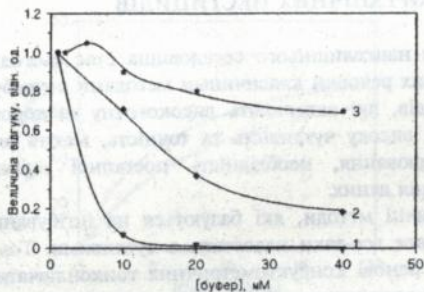


Рис. 11. Калібрувальні криві кондуктометричного глюкозного біосенсора в стаціонарному режимі вимірювань з додатковими NAFION-мембранами різної товщини: 1 - без NAFION-мембрани, 2 - 1 шар, 3 - 2 шара, 4 - 3 шара, 5 - 4 шара NAFION-полімеру. Вимірювання проводились в 40 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7.4.

частинками буферу транспорту протонів, відповідно збільшується провідність в мембрані.

Біологічні рідини мають досить велику буферну ємність, тому важливим параметром глюкозного біосенсора є залежність відгуку сенсора від буферної ємності розчину. Як можна бачити з рис.12 величина відгуку сенсора значно зменшується зі збільшенням буферної ємності (крива 1) (в 10 разів при зміні концентрації буферу від 1 мМ до 10 мМ). Подальше збільшення концентрації буферу до 40 мМ вже незначно впливає на величину відгуку глюкозного кондуктометричного біосенсора. Залежність величини відгуку від буферної ємності можна пояснити тим, що в мембрані разом зі звичайною дифузією протонів із мембрани із-за градієнту їх концентрації присутня і полегшена дифузія, коли протони, що генеруються в ході ферментативної реакції, зв'язуються частинками буферу, який легко проникає до мембрани, тобто присутні два канали дифузії протонів із мембрани. Таким чином, чим більша буферна ємність розчину, тим більше протонів зв'язано, і, відповідно, тим менша величина відгуку.

На рис.11 показані калібрувальні криві в стаціонарному режимі вимірювань для глюкозного кондуктометричного біосенсора з додатковими NAFION-мембранами різної товщини. Видно, що збільшення товщини NAFION-мембрани приводить до збільшення динамічного діапазону роботи датчика до 10 мМ за рахунок дифузійного лімітування та до значного збільшення величини відгуку. Збільшення величини відгуку має місце із-за того, що при використанні NAFION-мембрани, ми позбавляємось від додаткового каналу полегшеної дифузії протонів із мембрани за рахунок, так званого, асоційованого з



**Рис.12.** Залежність величини відгуку кондуктометричного глюкозного біосенсора від концентрації буферного розчину без додаткової мембрани (1) та з додатковими NAFION (2) та ПВБ (3) мембранами. Вимірювання проводились в калій-фосфатному буфері, рН 7.4, концентрація додавляемої глюкози - 1 мМ.

Коли використовується додаткова NAFION-мембрана, то глюкозний кондуктометричний біосенсор стає менш чутливим до зміни буферної ємності середовища (крива 2). Таке зменшення впливу буферної ємності на відгук сенсора може бути пояснено властивостями NAFION-полімеру. Було показано, що дифузійний коефіцієнт всередині NAFION-мембрани для  $\text{Na}^+$  в 100 разів вище чим для  $\text{Cl}^-$  [Soldatkin et al, 1994]. Такий ефект визивається негативно-зарядженими сульфатними групами всередині NAFION-мембрани, що приводить до потенційного бар'єру для дифузії негативно-заряджених іонів. Тобто присутність NAFION-мембрани ефективно блокує

транспорт негативно-заряджених частинок буферу через мембрану, внаслідок чого блокується полегшений канал дифузії протонів із мембрани. Таким чином зменшується вплив буферної ємності середовища.

При використанні додаткової ПВБ-мембрани (крива 3), вплив буферної ємності середовища на величину відгуку глюкозного кондуктометричного біосенсора стає ще меншим. Це може бути пояснено бар'єрними властивостями ПВБ-шару для дифузії гідрофільних частинок буферу (нааявність гідрофобних груп та надлишкового негативного заряду).

Було вивчено залежність відгуку кондуктометричного глюкозного біосенсору від концентрації КСІ. Показано, що варіація іонної сили зразка не впливає на кінетику відгуку сенсора, тобто час відгуку біосенсора на додавання глюкози практично сталий. А так як чутливість кондуктометричного перетворювача лінійно залежить від фонові провідності середовища, то можна зробити висновок, що фонові концентрація іонів не впливає на ферментативну кінетику і масоперенос протонів в мембрані, але впливає на чутливість самого перетворювача, що приводить до зменшення сумарного відгуку при збільшенні концентрації КСІ. Присутність же додаткової NAFION-мембрани зменшує цей вплив за рахунок дифузійного лімітування.

Таким чином, розроблено лабораторний прототип ферментного кондуктометричного біосенсора для визначення концентрації глюкози в крові з поліпшеними характеристиками.



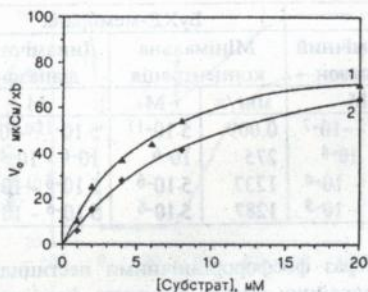
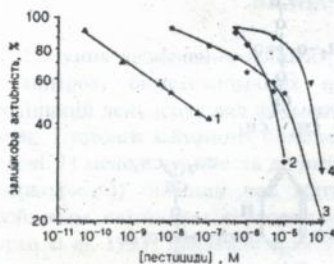


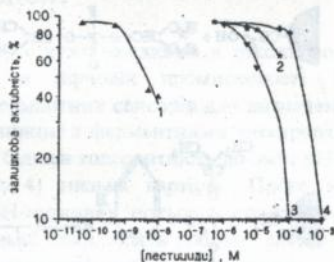
Рис. 13. Калібрувальні криві в кінетичному режимі вимірювань для кондуктометричних біосенсорів на основі АХЕ (крива 1) та БуХЕ (крива 2). Вимірювання проводились в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7.4.

На рис.13 наведено калібрувальні криві для кондуктометричного біосенсора з іммобілізованими АХЕ та БуХЕ в кінетичному режимі вимірювань. Можна бачити, що динамічний діапазон роботи біосенсорів в обох випадках дуже близький,  $K_{M(уяв)}$  складають 13.6 мМ для іммобілізованої АХЕ та 10.8 мМ для іммобілізованої БуХЕ та добре корелюють з величинами, отриманими іншими методами. Час відгуку таких біосенсорів складає 2 - 5 сек, що затрудняє вимірювання в кінетичному режимі, тому наступні вимірювання було вирішено проводити в стаціонарному режимі, тобто аналізувалась стаціонарна величина відгуку.

Калібрувальні криві для фосфорорганічних пестицидів приведені на рис.14.



(a)



(б)

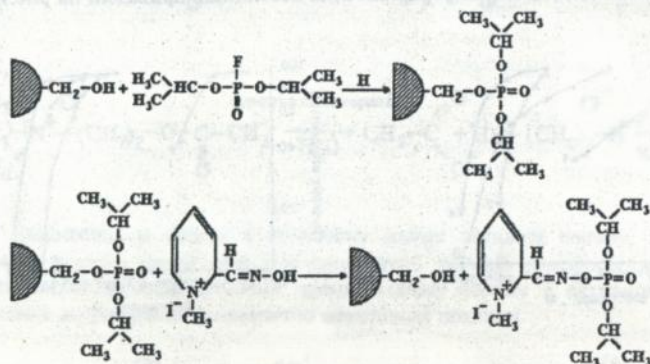
Рис. 13. Калібрувальні криві для кондуктометричного біосенсора на основі АХЕ (а) та БуХЕ (б) для визначення різних фосфорорганічних пестицидів: 1 - ДФФ, 2 - трихлорфон, 3 - параоксон-етил, 4 - параоксон-метил. Вимірювання проводились в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7.4, час інкубації в розчинах пестицидів - 10 хв.

Аналітичні характеристики таких біосенсорів зведені в табл. 2.

Таблиця 2. Характеристики кондуктометричних біосенсорів для визначення пестицидів.

Пестициди	АХЕ-мембрана			БуХЕ-мембрана		
	Мінімальна концентрація	Динамічний діапазон		Мінімальна концентрація	Динамічний діапазон	
		мкг/л	М		М	мкг/л
ДФФ	0.009	5·10 <sup>-11</sup>	5·10 <sup>-11</sup> - 10 <sup>-7</sup>	0.009	5·10 <sup>-11</sup>	5·10 <sup>-11</sup> - 10 <sup>-8</sup>
Параоксон-етил	2.8	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup> - 10 <sup>-4</sup>	275	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup> - 10 <sup>-4</sup>
Параоксон-метил	123	5·10 <sup>-7</sup>	5·10 <sup>-7</sup> - 10 <sup>-4</sup>	1237	5·10 <sup>-6</sup>	5·10 <sup>-6</sup> - 10 <sup>-3</sup>
Трихлорфон	128	5·10 <sup>-7</sup>	5·10 <sup>-7</sup> - 10 <sup>-5</sup>	1287	5·10 <sup>-6</sup>	5·10 <sup>-6</sup> - 10 <sup>-4</sup>

Інгібування іммобілізованих холінестераз фосфорорганічними пестицидами досить сильне та необратиме, тому при звичайних умовах відмивки фермент не відновлює свою активність на протязі довгого часу, що передбачає одноразове використання датчика. Наприклад, ДФФ в ході реакції приєднується до гідроксильної групи залишку серина в активному центрі. Ковалентний зв'язок, що утворюється, не порушується в водних розчинах, однак, може бути порушений більш нуклеофільними реагентами, такими, наприклад, як оксими. В данній роботі в експериментах використовувався піридин-2-альдоксим метйодид (ПАМ), який під час реакції порушує каталітично неактивний комплекс діізопропилфторфосфатного ефіру та відновлює активний центр фермента:



На рис.14 представлено величини відгуків сенсора за відсутності та в присутності пестициду, а також до та після реактивації 10<sup>-4</sup> М ПАМ (відгук, отриманий за відсутності інгібітора, приймається за 100 %). Можна бачити, що в випадку великого ступеня інгібування АХЕ величина відгуку відновлюється реактиватором не повністю. Це може бути пов'язано з дифузійними проблемами (коли оксими всередині мембрани терплять зміни під дією фосфорорганічних

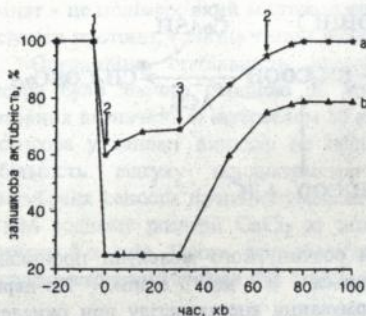


Рис. 14. Інгібування АХЕ, імуобілізованої в мембрані,  $10^{-8}$  М ДФФ з часом інкубації 10 хв (а) та 80 хв (б) та її реактивація. 1 - інгібування, 2 - відмивка в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4, 3 - відмивка реактиватором ПАМ.

пестицидів у водних розчинах та показано можливість відновлення активності імуобілізованого ферменту після дії на нього інгібіторів.

#### РОЗРОБКА КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО КЛІТИННОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЕТАНОЛУ

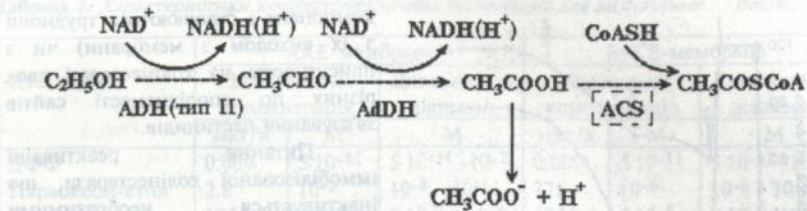
Питання визначення концентрацій етанолу є дуже важливим в токсикології, при контролі біотехнологічних процесів та в харчовій промисловості. На сьогоднішній день існує ряд ферментних та неферментних сенсорів для визначення етанолу. Переваги клітинних біосенсорів у порівнянні з ферментними електродами наступні: 1) менша чутливість до інгібування; 2) більша толерантність до змін рН та температури; 3) більший час життя сенсорів; 4) низька вартість. Проте вже розробленим клітинним сенсорам на основі рН-чутливих польових транзисторів (Kogran et al, 1993) притаманні деякі вади - низька стабільність робочих елементів (елемент одноразового застосування) за функціонування та зберігання. Для вирішення цієї проблеми було проведено пошук мікроорганізмів серед штамів дикого типу роду *Candida*, які здатні до росту на середовищі з етанолом та характеризуються високим рівнем закислення у відповідь на додавання  $C_2H_5OH$ . Встановлено, що клітини *Candida boidinii* 706 володіють необхідними властивостями і можуть бути застосовані для конструювання клітинних мікросенсорів для аналізу концентрації етанолу.

В основі роботи клітинного кондуктометричного біосенсора лежить реєстрація зміни провідності у мембрані з альгінату кальцію за рахунок процесу секреції кислих метаболітів клітинами метилотрофних дріжджів *C.boidinii* 706 при додаванні спирту у реакційне середовище.

компонент і створюються труднощі з їх виходом з мембрани) чи з присутністю на холінестеразі двох різних по спорідненості сайтів зв'язування пестицидів.

Питання реактивації імуобілізованої холінестерази, що інактивується необратимими інгібіторами, є дуже важливим, тому що реактивація дозволяє багатократно використовувати біосенсор для визначення концентрацій фосфорорганічних пестицидів.

Таким чином, розроблено лабораторний макет кондуктометричного ферментного біосенсора для визначення фосфорорганічних



Коли етанол добавляють в буферний розчин, його молекули проникають через клітинну мембрану і окислюються в два етапи. По-перше, алкогольдегідрогеназа (тип II) каталізує формування ацетальдегіду при окисненні етанолу, а потім ацетальдегід дегідрогеназа каталізує перетворення ацетальдегіду в оцтову кислоту. Відомо, що клітини метилотрофних дріжджів *H. Polymorpha* та *P. pinus*, вирощені на середовищі з етанолом, не здатні закислювати середовище інкубації у присутності  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ . Поява процесу ефективного викиду протонів у клітини дикого типу роду *Candida* може бути пояснена, перш за все, виникненням спонтанної мутації, яка призводить до пошкодження процесу окислення етанолу на стадії утворення оцтової кислоти і зачіпає активність ацетил-S-Co-синтетази (схема).

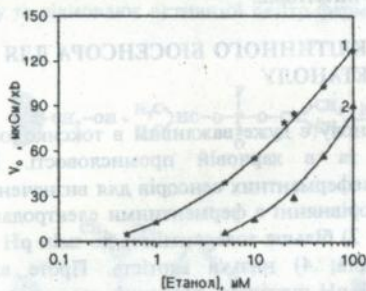


Рис. 15. Калібрувальна крива в кінетичному режимі вимірювань для кондуктометричного мікрононого сенсора на етанол. Вимірювання проводились в дистильованій воді (1) та 2 мМ/рН полімікс-буфері, рН 7.0 (2); концентрація клітин в мембрані - 20 мг/мл; концентрація  $\text{CaCl}_2$  - 10 мМ.

Мінімальна концентрація етанолу, що визначається, - 0.5 мМ. При збільшенні буферної ємності розчину спостерігалося значне зменшення величини сигналу. Це має місце внаслідок полегшеної дифузії протонів із мембрани, тому що протони дифундують із мембрани не тільки як вільні йони, але й під впливом взаємодії з частинками буферу, що приводить до залежності від буферної ємності.

Для вивчення залежності величини відгуку кондуктометричного клітинного біосенсора від рН використовували складну буферну систему, яка характеризується стабільною буферною ємністю у діапазоні рН 4.0 - 9.0. Отримано, що зміна рН середовища не впливає на величину відгуку сенсора. Це може бути пов'язано з впливом властивостей гелю-носія на процеси переносу протонів в мембрані.

Алгінат - це полімер, який містить в собі іоногенні карбоксильні групи, які можуть зв'язувати протони, і таким чином впливати на їх дифузію.

Операційна стабільність розробленого клітинного кондуктометричного сенсора була значно більшою за попередні розробки 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 функціонувала щоденно протягом 2-х годин та зберігалась у 20 мМ водному розчині  $\text{CaCl}_2$  за температури 20-25 °С, сигнал був стабільним протягом 3-х днів. Проте, при зберіганні робочих елементів сенсорів при 4 °С - кондуктометричний сигнал був стабільним протягом 12 днів.

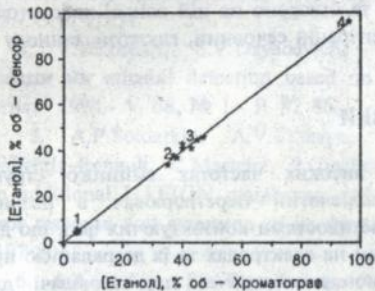


Рис. 15. Результати визначення концентрації етанолу в реальних рідинах: 1 - пиво, 2 - горілка та лікери, 3 - коньяки, 4 - харчовий спирт. Вимірювання проводились в дистильованій воді.

Результати визначення концентрації етанолу у реальних рідинах (пиво (1), горілка (2), коньяк (3) та харчовий спирт (4)), отримані за допомогою кондуктометричного сенсора на основі клітин *S.boidinii* 706 та методу газорідинної хроматографії представлено на рис.15. Всі виміри проводилися у дистильованій воді. Коефіцієнти розведення зразків складають 250 разів для горілки та коньяку, 500 разів для спирту та 25 разів для пива. Встановлено хороший рівень кореляції даних, отриманих за допомогою клітинного біосенсора, з результатами, визначеними референтним методом.

Коефіцієнт кореляції складає 0,9988.

Таким чином, розроблено кондуктометричний клітинний біосенсор для визначення концентрації етанолу в деяких алкогольних напоях на основі інтактних клітин метилотрофних дріжджів *Candida boidinii* 706.

## ЗАКЛЮЧЕННЯ

Кондуктометричний метод вимірювань може бути використаний для реєстрації перебігу ферментативних процесів. Він є універсальним, забезпечує більшу точність та меншу трудомісткість порівняно з загальновідомими методами біохімічного аналізу. Використання при виготовленні перетворювачів недорогої тонкоплівчатої стандартної технології разом з оптимізованою методикою іммобілізації біологічного матеріалу на їх поверхню дозволяє значно зменшити як собівартість таких пристроїв, так і вартість аналізу в цілому.

В роботі експериментально підтверджена можливість вивчення за допомогою кондуктометричних тонкоплівчатих перетворювачів взаємодії ферментів з субстратами та інгібіторами за різних умов та створено на цій основі лабораторні прототипи біосенсорів для визначення концентрацій сечовини, глюкози, етанолу та фосфорорганічних пестицидів.

## ВИСНОВКИ

1. Показано, що при роботі на високих частотах змінного струму електрохімічний імпеданс системи тонкоплівчатої перетворювач в розчині визначається головним чином об'ємними властивостями контактуючих фаз, що дає можливість знехтувати поверхневими ефектами на електродах та їх деградацією при зберіганні та дозволяє використовувати кондуктометричні перетворювачі для створення ферментних біосенсорів.

2. Розроблено лабораторний прототип уреазного кондуктометричного біосенсора з лінійним динамічним діапазоном роботи 0.1 - 5 мМ сечовини, який використано для визначення складу сечовини в крові.

3. Створено макет ферментного кондуктометричного біосенсора для визначення концентрації глюкози в крові з поліпшеними аналітичними характеристиками. Показано, що використання додаткових мембран з ПВБ та NAFION дозволяє розширити динамічний діапазон роботи датчику до 10 мМ глюкози без погіршення чутливості сенсора та значно зменшити вплив на величину відгуку біосенсора факторів середовища (рН, буферна ємність, іонна сила).

4. Розроблено лабораторний прототип кондуктометричного ферментного біосенсора для визначення фосфорорганічних пестицидів у водних розчинах. з високою чутливістю, яка склала  $5 \cdot 10^{-11}$  М для діізопропілфторфосфату,  $10^{-8}$  М для параоксон-етілу,  $5 \cdot 10^{-7}$  М для параоксон-метілу та  $5 \cdot 10^{-7}$  М для трихлорфону і показано можливість відновлення активності ферменту в мембрані, використовуючи реактиватор піридин-2-альдоксим метйодид.

5. Розроблено лабораторну модель кондуктометричного клітинного біосенсора для визначення концентрації етанолу на основі інтактних клітин метилотрофних дріжджів *Candida boidinii* 706 з динамічним діапазоном роботи у межах 5 - 100 мМ етанолу та показано, що сконструйований сенсор може успішно застосовуватись для визначення концентрації етилового спирту у деяких алкогольних напоях - пиві, горілці, коньяку та харчовому спирті.

## Список основных работ, опубликованных за темою дисертації

1. A.A.Shul'ga, S.V.Dzyadevich, A.P.Soldatkin, S.V.Patskovsky, V.I.Strikha. Conductometric biosensors for glucose and urea based on microfabricated thin-film interdigitated array-electrodes // *Biologi Italiani*.- 1993.- V. 23, N 6.- P. 40-45.
2. А.А.Шульга, С.В.Дзядевич, А.П.Солдаткин, С.В.Пацковский, Н.Ф.Стародуб, В.И.Стриха, А.В.Ельская. Тонкопленочный кондуктометрический энзимобиосенсор для определения глюкозы и мочевины в крови // *Электрохимия*.- 1993.- Т. XXIX, № 8.- Стр. 998-1002.
3. С.В. Дзядевич, Я.И.Корпан, А.П.Солдаткин, А.А.Шульга, В.И.Стриха, А.В.Ельская. Использование кондуктометрических микросенсоров для определения кинетических параметров ферментов // *Укр. биохимический журнал*.- 1993.- Т. 65, № 5.- Стр. 47-54.
4. Y.I.Korpan, S.V.Dzyadevich, V.P.Zharova, A.V.El'skaya. Conductometric biosensor for ethanol detection based on whole yeast cells // *Ukrainian Biochemical Journal*.- 1994.- V. 66, № 1.- P. 82-86.
5. A.P.Soldatkin, A.V.El'skaya, A.A.Shul'ga, A.S.Jdanova, S.V.Dzyadevich, N.Jaffrezic-Renault, C.Martelet, P.Clechet. Glucose sensitive conductometric biosensor with additional NAFION membrane: reduction of influence of buffer capacity on the sensor response and extension of its dynamic range // *Anal. Chim. Acta*.- 1994.- 288.- P. 197-203.
6. A.A.Shul'ga, S.V.Dzyadevich, A.P.Soldatkin, S.V.Patskovsky, V.I.Strikha & A.V.El'skaya. Thin-film Conductometric Biosensor for Glucose and Urea Determination // *Biosensors & Bioelectronics*.- 1994.- V. 9.- P. 217-223
7. С.В.Дзядевич, А.А.Шульга, С.В.Пацковский, В.Н.Архипова, А.П.Солдаткин, В.И.Стриха. Тонкопленочный кондуктометрический датчик для ферментных биосенсоров // *Электрохимия*.- 1994.- Т. XXX, № 8.- С.982-987.
8. С.В.Дзядевич, А.П.Солдаткин, А.А.Шульга, В.И.Стриха, А.В.Ельская. Кондуктометрический биосенсор для определения фосфоорганических пестицидов // *Журнал аналитической химии*.- 1994.- Т. 49, № 8.- Стр. 874-878.
9. С.В.Дзядевич, А.П.Солдаткин, В.К.Росохатый, Н.Ф.Шрам, А.А.Шульга, В.И.Стриха. Амперометрический ферментный биосенсор с мембраной глюкозооксидаза-полианилин // *Укр. биохимический журнал*.- 1994.- Т. 66, № 3.- С. 54-60.
10. С.В.Дзядевич, О.П. Солдаткин. Кондуктометричний метод вимірювань в ферментному аналізі // *Укр. біохімічний журнал*.- 1994.- Т. 66, № 4.- С. 30-42.
11. A.M.Nyamsi Hendji, N.Jaffrezic-Renault, C.Martelet, A.A.Shul'ga, S.V.Dzyadevich, A.P.Soldatkin, A.V.El'skaya. Enzyme biosensor based on micromachined interdigitated conductometric transducer: application to the detection of urea, glucose, acetyl and butyrylcholine chlorides // *Sensors and Actuators*.- 1994.- B 21.- P. 123-129.
12. S.V.Dzyadevich, G.A.Zhytyak, Y.I.Korpan, A.P.Soldatkin, A.V.El'skaya. Application of conductometric biosensor for studying urease inactivation by heavy metal ions // *Technical Digest of the Fifth International Meeting on Chemical Sensors, Rome, 1994, July 11-14*.- Roma: "Fratelli Palombi srl".- 1994.- P.189-192.

Dzyadevich S.V. Elaboration of enzyme and cell conductometric biosensors for determining of concentrations of some substrates and inhibitors of enzymes.

Thesis for a degree of Doctor of Philosophy (PhD) in Biology, Special Option - Biotechnology, A.V.Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 1995.

The thesis contains the results on elaboration of laboratory prototypes of highly-selective enzyme and cell conductometric biosensors for determining of concentrations of urea, glucose, ethanol and organophosphorus pesticides. Physical and chemical processes into electrochemical conductometric cell as well as influence of immobilization on properties of enzymes and dependence of value of biosensor response on parameters of sample solution are investigated. The optimization of working parameters of enzyme conductometric biosensors and ways for improvement of their analytical characteristics are determined. It is established that the formation of an additional membranes of the definite nature results in extension of the dynamic range of the sensor and substantial reduction of influence of the medium factors such as pH, buffer capacity and salt concentration in solution.

Дзядевич С.В. Разработка ферментных и клеточных кондуктометрических биосенсоров для определения концентраций некоторых субстратов и ингибиторов ферментов.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.23 - биотехнология, Институт биохимии им.А.В.Палладина НАН Украины, Киев, 1995.

В диссертационной работе представлены результаты по разработке лабораторных макетов высокоселективных ферментных и клеточных кондуктометрических биосенсоров для определения концентраций мочевины, глюкозы, этанола и фосфорорганических пестицидов. Исследованы физико-химические процессы в электрохимической кондуктометрической ячейке, влияние иммобилизации на свойства ферментов, зависимости величины сигналов биосенсора от параметров реакционной среды. Определены оптимальные условия работы ферментных кондуктометрических биосенсоров и пути улучшения их аналитических характеристик. Установлено, что использование дополнительных мембран определенной природы позволяет расширить динамический диапазон работы датчиков без ухудшения их чувствительности и значительно уменьшить влияние факторов среды (рН, буферная емкость, концентрация солей в растворе).

**Ключові слова:** биосенсор, кондуктометричний метод, імпеданс, глюкоза, сечовина, фосфорорганічні пестициди, етанол.

*S. Dzyadevich*

Підписано до друку 26.12.94р Формат 60x84/16  
Папір друк. Умов. друк. л. 1,0. Тираж 100 примірник. Заказ №1893

---

Надруковано ЦУОП ДНІП "Плодвінконсерв" м. Київ , Саксаганського , 1

457227

AB 31.771

**AB 31.771**