
BIOSENSORS

БІОСЕНСОРИ

УДК 577.15.08:543.9

РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛУТАМАТУ

Д. Ю. Кучеренко^{1,2}, І. С. Кучеренко^{1,2}, О. О. Солдаткін^{1,2}, Т. О. Борисова³, С. В. Дзядевич^{1,2}, О. П. Солдаткін^{1,2}

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, 03680, м. Київ, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, 01003, м. Київ, Україна

³Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України,
вул. Леонтовича, 9, 01601, м. Київ, Україна

e-mail: didukh.d@gmail.com, kucherenko.i.s@gmail.com, alex_sold@yahoo.com, tborisov@
biochem.kiev.ua, a_soldatkin@yahoo.com

РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНОГО БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛУТАМАТУ

Д. Ю. Кучеренко, І. С. Кучеренко, О. О. Солдаткін, Т. О. Борисова, С. В. Дзядевич, О. П. Солдаткін

Анотація. В даній роботі розроблено амперометричний біосенсор, що призначений для визначення концентрацій глутамату (глутамінової кислоти). Для створення біоселективного елементу біосенсора використовували фермент глутаматоксидазу, який був іммобілізований ковалентною зшивкою глутаровим альдегідом з бичачим сироватковим альбуміном. Як амперометричні перетворювачі використовувались дискові платинові електроди. Отримані біосенсори демонстрували високу чутливість до глутамату. Лінійний діапазон біосенсорного визначення субстрату знаходився в межах від 2 мкМ до 600 мкМ. Досліджено вплив параметрів розчину (іонна сила, рН, буферна ємність) на роботу розробленого біосенсора. Показано, що розроблений біосенсор характеризується доброю відтворюваністю відгуків впродовж декількох годин безперервної роботи та операційною стабільністю протягом декількох днів. Біосенсор в подальшому може бути використаний для визначення концентрації глутамату у біологічних або харчових зразках.

Ключові слова: амперометричний електрод, біосенсор, іммобілізовані ферменти, глутаматоксидаза, глутамат, м-фенілендіамін

DEVELOPMENT OF AMPEROMETRIC BIOSENSOR FOR GLUTAMATE DETERMINATION

D. Yu. Kucherenko, I. S. Kucherenko, O. O. Soldatkin, T. O. Borisova, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin

Abstract. In this work an amperometric biosensor for glutamate determination was developed. Bioselective element of the biosensor was based on enzyme glutamate oxidase, which was immobilized by a covalent cross-linking via glutaraldehyde with bovine serum albumin. Platinum disk electrodes were used as amperometric transducers. The obtained biosensors demonstrated good sensitivity to glutamate. Linear range of glutamate determination was from 2 μM to 600 μM . Influence of properties of working buffer (ionic strength, pH, buffer capacity) on the biosensor work was investigated. It was shown that the developed biosensor is characterized by a good reproducibility of responses during several hours of continuous work and operational stability during several days. The biosensor can be further used for analysis of glutamate concentration in biological or food samples.

Keywords: Amperometric electrode, biosensor, immobilized enzymes, glutamate oxidase, glutamate, phenylenediamine

РАЗРАБОТКА АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО БИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЛУТАМАТА

Д. Ю. Кучеренко, И. С. Кучеренко, А. А. Солдаткин, Т. А. Борисова, С. В. Дзядевич, А. П. Солдаткин

Аннотация. В данной работе разработано амперометрический биосенсор, предназначенный для определения концентрации глутамата (глутаминовой кислоты). Для создания биоселективного элемента биосенсора использовали фермент глутаматоксидазу, который был иммобилизован ковалентной сшивкой глутаровым альдегидом с сывороточным альбумином быка. Как амперометрические преобразователи использовали дисковые платиновые электроды. Полученные биосенсоры демонстрировали высокую чувствительность к глутамату. Линейный диапазон биосенсорного определения субстрата находился в пределах от 2 мкМ до 600 мкМ. Исследовано влияние параметров раствора (ионная сила, pH, буферная емкость) на работу разработанного биосенсора. Показано, что разработанный биосенсор характеризуется хорошей воспроизводимостью откликов на протяжении нескольких часов непрерывной работы, а также операционной стабильностью на протяжении нескольких дней. Биосенсор в дальнейшем может использоваться для определения концентрации глутамата в биологических или пищевых образцах.

Ключевые слова: амперометрический электрод, биосенсор, иммобилизованные ферменты, глутаматоксидаза, глутамат, м-фенилендиамин

1. ВСТУП

Моніторинг концентрації біологічно активних речовин в живому організмі та в лабораторних зразках є актуальним завданням для сучасної молекулярної біології та біотехнології. До таких біологічно активних речовин належить ключові метаболіти, гормони, нейротрансмітери, в тому числі глутамат (глутамінова кислота). Ця амінокислота відіграє важливу

роль в життєдіяльності організму людини і інших ссавців, особливо у функціонуванні центральної нервової системи. Зокрема, глутамат є основним збуджуючим нейротрансмітером в ЦНС ссавців. Також він відіграє важливу роль в азотистому обміні. Концентрація глутамату в окремих частинах організму може впливати на розвиток інфарктів, інсультів та різні нейропатологічні стани [1].

Глутамат входить до складу багатьох фармацевтичних препаратів завдяки тому, що він має здатність сенсibiliзувати смакові рецептори і стимулювати діяльність мозку. Також в невеликих кількостях він міститься в багатьох продуктах харчування [2, 3]. Присутність в їжі глутамату надає їй «м'ясного» смаку, тому глутамат часто застосовують в якості підсилювача смаку, додаючи його до багатьох харчових продуктів. Тому повністю виключити глутамат з раціону харчування досить проблематично.

Визначення глутамату займає важливе місце в клінічній біохімії при діагностиці захворювань, що пов'язані з різкими змінами рівня глутамату в організмі, зокрема хвороб печінки та серцево-судинної системи [4, 5]. Також в клінічних лабораторіях глутамат використовують під час визначення активності деяких амінотрансфераз.

Таким чином, область практичного застосування глутамату неперервно збільшується. Через це виникає потреба в методах точної та швидкої детекції глутамату для потреб нейрофізіології і нейропатології, фундаментальної та клінічної медицини, фармацевтичної та харчової промисловості, а також в аналітичній біохімії та біотехнології [1, 4, 5].

Сучасні стандартні методи високоточного визначення глутамату, такі як спектрофотометрія та рідинна хроматографія, потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання. [1, 4, 6].

Крім цих методів, також може використовуватись хемолюмінесцентне визначення за участю люмінолу і фериціаніду калію і застосуванням люмінофотометра [7]. Споживання кисню при окисленні глутамату може бути зафіксоване кисневим волоконно-оптичним датчиком, який фіксує зміни люмінесценції спеціально нанесеного шару, який чутливий до концентрації кисню [2]. Для визначення кількості глутамату в м'ясі та м'ясних продуктах використовується метод за участю двох ферментативних реакцій, в результаті яких окислюється глутамат і утворюється кольорова сполука (формазан), концентрація якої вимірюється на спектрофотометрі [8].

Недоліком наведених вище методів є необхідність в досить складній попередній підготовці проб для аналізу і непридатність для

швидкого аналізу великої кількості зразків чи для моніторингу процесу в режимі реального часу.

Тому сьогодні дуже актуальним є питання створення більш зручного, точного, швидкого, селективного та дешевого методу визначення вмісту глутамату в досліджуваних зразках. Способом вирішення указаних вище проблем є використання нових біоаналітичних приладів – біосенсорів [9].

Біосенсори завдяки своїй селективності, відсутності необхідності в пробопідготовці та високій швидкості аналізу можуть найкраще підходити для визначення концентрації глутамату.

Найбільш перспективними і успішними серед електрохімічних біосенсорів вважаються амперометричні біосенсори. Саме вони найчастіше використовуються для визначення глутамату [1, 3-5, 10].

Крім амперометричних, для визначення глутамату можна використовувати також потенціометричні електроди (детекція NH_4^+), хоча вони є менш чутливими.

Для селективного визначення глутамату в мозку було розроблено систему іммобілізованих на кераміці платинових мікроелектродів, покритих електрополімеризованим гіперокисленим поліпіролом [11].

Використання в біосенсорних системах автоматичного проточно-ін'єкторного пристрою може бути корисним для моніторингу процесу з метою динамічного визначення глутамату в режимі реального часу [4, 12].

Використання модифікованого графітного електроду із стабілізуючими добавками дозволило створити біосенсор для визначення глутамату з довгим терміном зберігання [13, 14].

В більшості робіт з розробки біосенсорів на глутамат використовується фермент L-глутаматоксидаза, отримана з різних джерел [15-19]. При розробці біосенсорів для визначення глутамату використовують також ферменти глутаматдекарбоксилазу, глутаматдегідрогеназу і глутаматсинтетазу [1], але глутаматоксидаза значно перевершує їх по характеристикам.

На даний час розроблено біосенсорні системи для визначення глутамату в багатьох реальних зразках: в продуктах харчування і

фармацевтичних препаратах [1, 5, 12], в культурах клітин [10], в сироватці крові та сечі [1, 4], в мікродіалізатах при нейрофізіологічних дослідженнях [20, 21] та для контролю за ферментацією в харчовій промисловості.

Метою даної роботи була розробка амперометричного біосенсора на основі глутаматоксидази з метою вимірювання концентрації глутамату в зразках із центральної нервової системи щурів. Було детально досліджено та проаналізовано аналітичні характеристики біосенсора при визначенні глутамату в модельних зразках, після чого планується провести вимірювання вмісту глутамату у зразках ЦНС.

В подальшому даний біосенсор планується використати як складовий елемент масиву біосенсорів для визначення одразу кількох біологічно важливих речовин.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. МАТЕРІАЛИ

В роботі було використано ферменти глутаматоксидазу (ГлОД, ЕС 1.4.3.11) із *Streptomyces sp.* з активністю 7 од.акт.мг⁻¹ фірми Yamasa Corporation (Токіо, Японія). Бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V), гліцерол, HEPES та 50 % водний розчин глутарового альдегіду (ГА) було отримано від фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина). L-глутамінова кислота була отримана від фірми Affymetrix (USA). КН₂РО₄ та інші сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“.

2.2. КОНСТРУКЦІЯ АМПЕРОМЕТРИЧНИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ

В роботі як амперометричні перетворювачі використовували платинові дискові електроди власного виробництва. Виготовлення мікроелектродів проводили за відпрацьованим алгоритмом. При їх створенні, спочатку платиновий дріт діаметром 0,4 мм і довжиною 3 мм запаювали в кінцевій частині скляного капіляра із зовнішнім діаметром 3,5 мм. Відкритий торець дроту виступав робочою поверхнею перетворювача. Потім платиновий дріт за допомогою легкоплавкого сплаву Вуда з'єднували з провідником, розміщеним всере-

дині капіляра. На другому кінці провідника приєднували контактну площадку для підключення до вимірювальної установки. Робочу поверхню електродів отримували шліфуванням із використанням порошку оксиду алюмінію (розмір частинок 0,1 мкм та 0,05 мкм) та обробляли спиртом перед іммобілізацією біоселективного елемента. Періодично електродну поверхню поновлювали за допомогою такого ж шліфування.

2.3. МОДИФІКАЦІЯ АМПЕРОМЕТРИЧНИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ ФЕНІЛЕНДІАМІНОМ

Робота амперометричних біосенсорів базується на вимірюванні струму, що протікає через робочий електрод при прикладанні відповідного потенціалу. В нашій роботі цей струм формується внаслідок окиснення перекису водню, продукту ферментативної реакції окиснення глутамату, на робочому електроді. Оскільки в розчині можуть бути наявні інші електроактивні сполуки, які також будуть окислюватись на електроді та приводити до похибки у вимірюваннях, селективність амперометричного електроду може бути покращена шляхом нанесення на електрод додаткової полімерної мембрани, яка обмежувала б дифузію інтерферуючих речовин до поверхні електроду. Як відомо з-поміж широкого класу окси- та аміноароматичних речовин, які здатні до електрополімеризації, в біосенсорах найчастіше використовують ізомери фенілендіаміну [22, 23]. В даних джерелах було проведено ряд порівняльних досліджень щодо властивостей полімерних мембран на основі полі(фенілендіаміну) (ПФД), отриманих з різних мономерів. В результаті виявилось, що найкращою селективністю характеризувались перетворювачі модифіковані полімерною плівкою на основі мета-фенілендіаміну. Відповідно, в нашій роботі цю речовину і було використано в якості мономера для створення додаткової мембрани на поверхні платинового електроду за методикою, описаною в [23]. Для формування ПФД мембрани триелектродну систему з чистим робочим електродом занурювали у 5 мМ розчин м-фенілендіаміну, після чого отримували 4-5 циклічних вольтам-

перограм. Перевірка ефективності ПФД мембрани була проведена в роботі [24]. Після цього поверх ПФД мембрани іммобілізували біоселективні елементи.

2.4. ВИГОТОВЛЕННЯ БІОСЕЛЕКТИВНИХ ЕЛЕМЕНТІВ

Біоселективні елементи біосенсорів отримували шляхом ковалентної іммобілізації ферментів і допоміжних речовин на поверхню амперометричного перетворювача. Вихідний розчин містив 8 % (тут і далі – масова частка) ГлОД, 4 % БСА у 100 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, з 10 % гліцерином. Гліцерин додавали, щоб стабілізувати ферменти впродовж їх іммобілізації, запобігти передчасному висиханню і поліпшити адгезію мембрани до поверхні перетворювача. Перед нанесенням на поверхню перетворювачів цей розчин змішували з 0,4 % водним розчином глутарового альдегіду (зшиваючого агенту) у пропорції 1:1. Одразу після цього суміш наносили на робочі поверхні перетворювачів та висушували протягом 40 хв. на повітрі за кімнатної температури. Після іммобілізації, біосенсори відмивали в робочому буферному розчині від незв'язаних компонентів біомембрани та надлишку глутарового альдегіду.

2.5. МЕТОДИКА ВИМІРЮВАННЯ

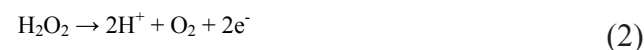
В роботі використовувалась триелектродна схема амперометричного аналізу. Робочі амперометричні електроди, допоміжний платиновий електрод та Ag/AgCl електрод порівняння (хлорсрібний) підключались до потенціостату PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди). 8-ми канальний пристрій (CH-8 multiplexer) того ж виробника, що підключався до потенціостату, дозволяв отримувати сигнали одночасно з 8 робочих електродів, проте зазвичай до нього були підключені 2 – 3 робочі електроди. Відстань між допоміжним платиновим електродом та усіма робочими біосенсорами в процесі вимірювання була однаковою і складала приблизно 5 мм. Виміри проводили за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці об'ємом 3,5 мл при постійному перемішуванні та при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електро-

да порівняння. Робочим буфером виступав 25 мМ NEPES з рН 7,4. Усі дослідження проводились у трьох повторностях.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. ПРИНЦИП РОБОТИ БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛУТАМАТУ

В основі роботи амперометричного біосенсора для визначення глутамату лежить ферментативна реакція (1), що протікає в біоселективній мембрані. В результаті реакції відбувається окиснення глутамату і утворення електрохімічно-активного перекису водню. При прикладанні позитивного потенціалу на електроді відбувається реакція розкладу перекису водню (2), в результаті якої утворюються електрони, що безпосередньо реєструються амперометричним перетворювачем:



3.2. ВПЛИВ рН БУФЕРУ НА ВІДГУКИ БІОСЕНСОРА

Як відомо, внаслідок іммобілізації ферменту може змінюватись рН оптимум його роботи. Тому на початку роботи було проведено дослідження впливу рН робочого розчину на роботу розробленого амперометричного біосенсора для визначення глутамату. Для проведення експерименту було використано універсальний буфер (що містив тріс-НСl, KH_2PO_4 , лимонну кислоту та тетраборат натрію в концентраціях 10мМ), який має однакову буферну ємність у широкому діапазоні значень рН. Дослідження проводились у діапазоні рН від 5,95 до 8,1.

Результати експерименту наведено на Рис. 1. Як бачимо, значного збільшення відгуку при якомусь конкретному значенні рН не спостерігається, що свідчить про можливість використання біосенсора в досить широкому діапазоні рН.

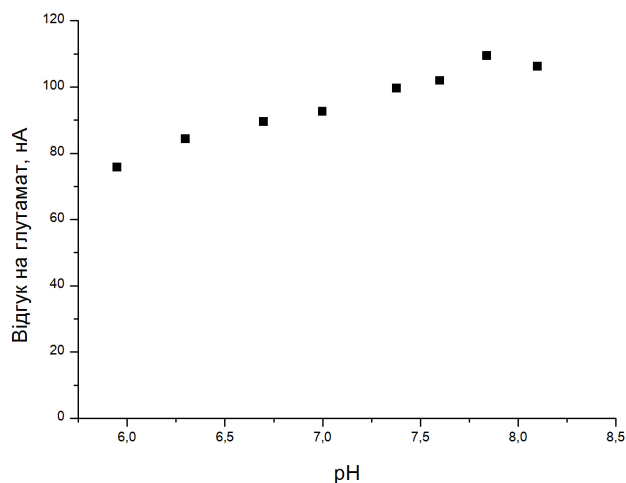


Рис. 1. Залежність величини відгуків біосенсора на основі ГЛОД від рН робочого буферного розчину. Концентрація глутамату – 1 мМ. Вимірювання проводились в універсальному буфері за різних значень рН, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.3. ВПЛИВ ІОННОЇ СИЛИ РОЗЧИНУ НА РОБОТУ БІОСЕНСОРА

Як відомо, робота кожного біосенсора залежить як від його власних характеристик, так і від властивостей розчину, в якому виконують вимірювання. Реальні біологічні зразки, крім наявності в них різних електроактивних сполук, можуть характеризуватися значною іонною силою. Наприклад, присутніми можуть бути іони металів, що є в будь-яких клітинах: K^+ , Na^+ , Mg^{2+} та ін., а також іони органічних та неорганічних кислот. Іонна сила розчину змінюється також залежно від концентрації буферного розчину.

Тому ми вирішили дослідити роботу біосенсора в залежності від різних значень іонної сили. В якості джерела іонів було використано 3,3 М розчин KCl, який додавали до робочої комірки в різних аліквотах, щоб отримати в робочому буфері концентрації від 1 мМ до 250 мМ. Далі отримували відгуки біосенсора на 100 мкМ глутамату.

Результати дослідження представлено на Рис. 2. Як бачимо, значних змін відгуків біосенсора на глутамат, при наявності в робочій комірці різних концентрацій KCl, не спостерігалось, що є типовим для амперометричних біосенсорів. Це свідчить про можливість вико-

ристання даного біосенсора в біологічних розчинах, що характеризуються різною іонною силою.

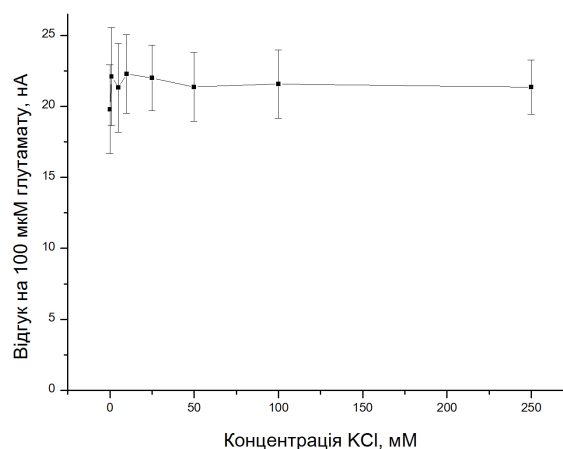


Рис. 2. Залежність величини відгуків біосенсора на основі ГЛОД від іонної сили розчину. Концентрація глутамату - 100 мкМ. Вимірювання проводились у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.4. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ БУФЕРНОЇ ЄМНОСТІ НА ВІДГУКИ БІОСЕНСОРА

Оскільки властивості буферу, в якому проводять вимірювання, впливають на роботу біосенсорів, то було вирішено дослідити також вплив концентрації буфера (буферної ємності) на величину відгуків біосенсора.

На Рис. 3 наведено результати перевірки залежності відгуків розробленого біосенсора для визначення глутамату від концентрації робочого буферного розчину.

Як бачимо, величини відгуків біосенсора практично не змінювались зі збільшенням концентрації буферу. Це дає можливість використовувати розроблений біосенсор для визначення глутамату в біологічних зразках, що характеризуються різними буферними ємностями.

3.5. ВІДТВОРЮВАНІСТЬ ВІДГУКІВ БІОСЕНСОРА ПРИ ВИЗНАЧЕННІ ГЛУТАМАТУ

Відтворюваність відгуків біосенсора є одним з основних показників якості його робо-

ти. Для того, щоб мати змогу досить точно вимірювати концентрацію глутамату в розчині, відгуки біосенсора повинні бути практично однаковими. Тим більш це дуже важливо, коли потрібно вимірювати малі концентрації.

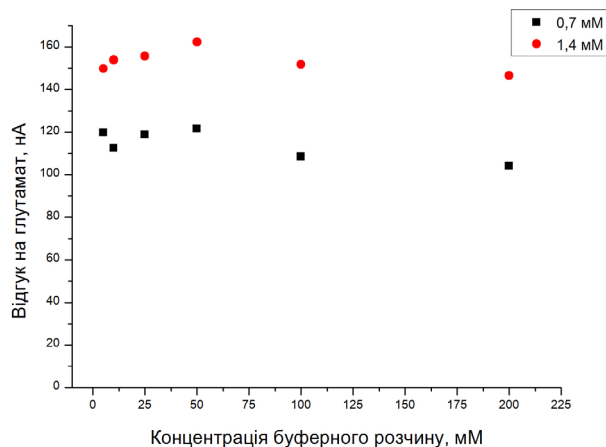


Рис. 3. Залежність величини відгуків біосенсора на основі ГЛОД від буферної ємності розчину. Концентрація глутамату – 0,7 мМ та 1,4 мМ. Вимірювання проводились у HEPES буфері за різних концентрацій, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Тому на першому етапі роботи було досліджено відтворюваність відгуків біосенсорів впродовж декількох годин безперервної роботи. Одне вимірювання глутамату займало 3 – 5 хв., проміжок між вимірюваннями складав близько 10 хв.; за цей час біосенсори відмивали від субстратів, кілька разів змінюючи робочий буфер.

Результати дослідження відтворюваності відгуків біосенсорів на глутамат представлено на Рис. 4. Помітного падіння відгуків за 10 вимірювань не відбувалось; відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на глутамат в середньому становило 5 %.

Також з отриманих даних було пораховано, наскільки змінюється межа визначення глутамату при роботі біосенсора впродовж дня (Рис. 5). Найбільша чутливість спостерігалась на початку роботи біосенсора (одразу після іммобілізації ферменту), а під час безперервної роботи біосенсора межа визначення дещо збільшувалась, однак підвищення було несуттєвим. Воно пов'язане зі збільшенням рівня шуму біосенсора впродовж роботи.

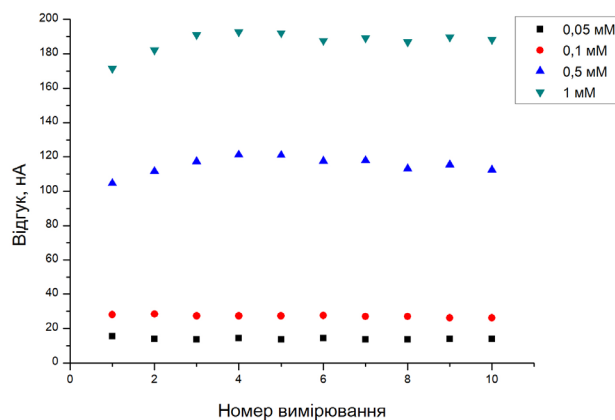


Рис. 4. Відтворюваність відгуків біосенсора на глутамат впродовж 10 вимірювань. Концентрації глутамату – 0,05 мМ, 0,1 мМ, 0,5 мМ, 1 мМ. Вимірювання проводились у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

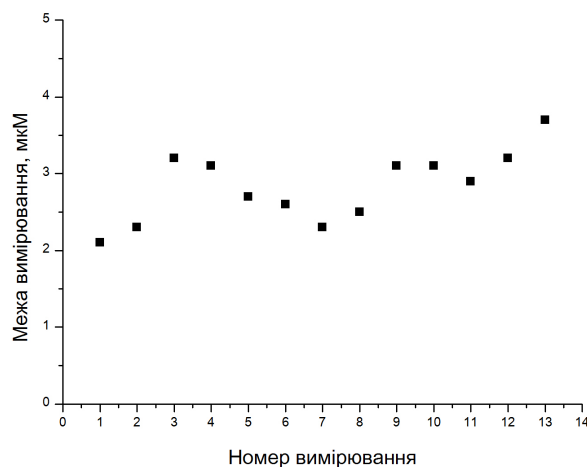


Рис. 5. Зміна межі вимірювання біосенсора на глутамат впродовж кількох годин. Концентрація глутамату становила 50 мкМ. Вимірювання проводились у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.6. АНАЛІТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ БІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ГЛУТАМАТУ

При використанні 25 мМ HEPES буферу, рН 7,4, межа вимірювання глутамату, яка вимірювалась як концентрація глутамату, що дає відгук в три рази більший за величину шуму базової лінії, становила 0,5 – 4 мкМ. Вона несуттєво змінювалась в залежності від конкретного біосенсора та зростала в процесі вико-

ристання біосенсора. Лінійний діапазон роботи був від 2 – 5 мкМ до 600 – 800 мкМ (залежно від конкретного біосенсора), чутливість до глутамату становила 250 – 300 нА/мМ.

Типова калібрувальна крива біосенсора для визначення глутамату наведена на Рис. 6. Лінійна ділянка даної калібрувальної кривої описується рівнянням $I=315 \cdot C$ ($R^2=0,996$), де I – сила струму після виходу відгуку на плато (нА), C – концентрація глутамату (мМ).

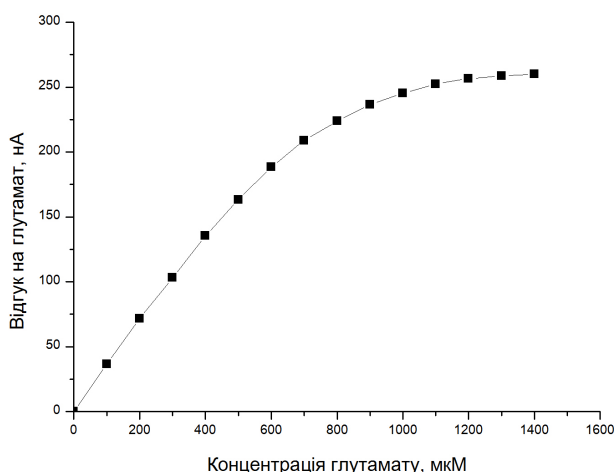


Рис. 6. Калібрувальна крива біосенсора на основі ГЛОД для визначення глутамату. Вимірювання проводились у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.7. ОПЕРАЦІЙНА СТАБІЛЬНІСТЬ ТА ЗБЕРІГАННЯ БІОСЕНСОРА

Дуже важливою в роботі біосенсорів є можливість їх використання протягом тривалого часу для багатьох вимірювань. Але часто в процесі роботи відбувається часткове вимивання компонентів з біологічної мембрани з поверхні перетворювача. Це відбувається внаслідок перемішування буферного розчину в робочій комірці. Також відбувається певне зменшення активності ферменту в процесі зберігання. Все це може призводити до певного падіння відгуків біосенсорів в процесі роботи.

Тому метою наступного етапу роботи була перевірка операційної стабільності розробленого біосенсора на основі ГЛОД. Для цього впродовж дня отримували 8-12 відгуків на чотири різні концентрації глутамату (в діапазоні від 0,05 мМ до 1 мМ), після чого біосенсор зберігали в сухому вигляді за температури

+4°C до наступного використання. Далі, через кілька діб, знову протягом кількох годин отримували відгуки біосенсорів на ті самі концентрації глутамату. Сумарний термін зберігання біосенсорів становив 11 діб.

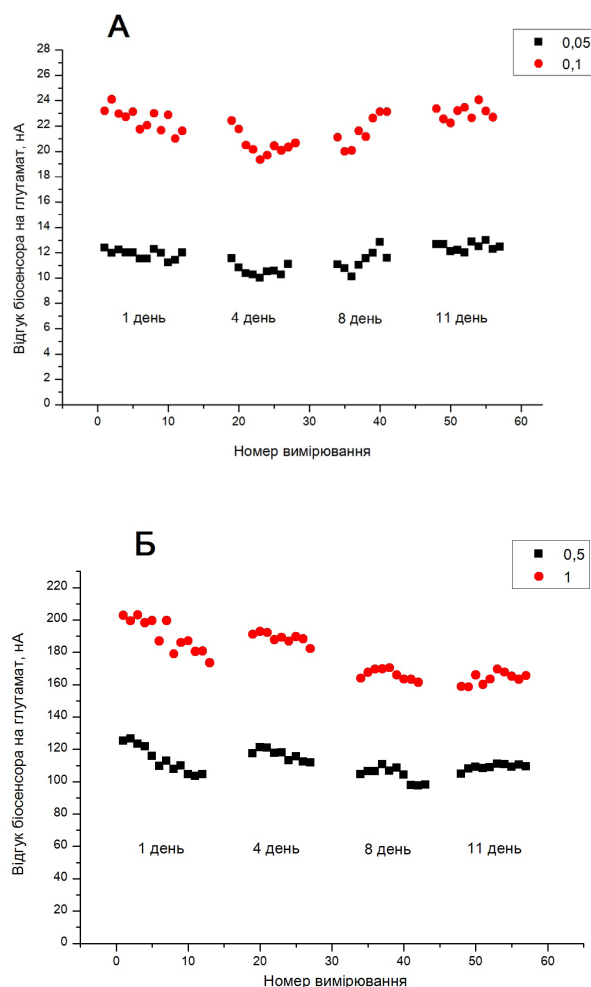


Рис. 7. Операційна стабільність відгуків біосенсора на глутамат впродовж декількох днів. Концентрації глутамату – 0,05 мМ, 0,1 мМ (А) та 0,5 мМ, 1 мМ (Б). Вимірювання проводились у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Результати дослідження представлено на Рис. 7. Як видно з рисунку, відгуки на невеликі концентрації глутамату залишались стабільними протягом всього періоду вимірювань. З іншого боку, відгуки на великі концентрації глутамату дещо зменшувались. Це свідчить про те, що в процесі роботи відбувалося деяке

вимивання ферменту із біоселективного елемента. Але його було достатньо для переробки невеликих концентрацій глутамату, однак великі концентрації глутамату фермент переробити до кінця вже не міг, що і призводило до зменшення відгуків.

Також в даній роботі проводили дослідження зміни активності біомембран при більш тривалому зберіганні розроблених біосенсорів – протягом двох місяців. Зберігання проводили за температури -18°C у сухому вигляді. За цей час біосенсори втратили 25 % активності.

4. ВИСНОВКИ

В роботі було розроблено амперометричний біосенсор для визначення глутамату та досліджено вплив складу робочого розчину на його аналітичні характеристики. Показано, що біосенсор може працювати в широкому діапазоні значень рН. Дослідження роботи біосенсора при різних концентраціях КСІ показало, що відгуки біосенсора на глутамат не залежать від іонної сили розчину. Показано, що концентрація буферного розчину (буферна ємність) також не впливає на відгуки біосенсора. Вивчено відтворюваність відгуків біосенсорів на глутамат впродовж дня (відносно середньоквадратичне відхилення відгуків становило 3-9 %). Перевірка операційної стабільності біосенсорів показала можливість ефективного їх використання після зберігання. При зберіганні біосенсорів при -18°C спостерігалося незначне зменшення активності біосенсорів впродовж двох місяців.

Пропонований біосенсор в подальшому планується використати для вимірювання зразків рідин, отриманих із ЦНС щурів, та для створення масиву біосенсорів для одночасного визначення різних біологічно активних речовин у водних зразках.

ПОДЯКА

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація».

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- [1]. R.L. Villarta, D.D. Cunnigham, G.G. Guilbault. Amperometric enzyme electrodes for the determination of L-glutamate // *Talanta*, 38, pp. 49-55 (1991).
- [2]. B.A.A. Dremel, R.D. Schmid. Comparison of two fibre-optic L-glutamate biosensors based on the detection of oxygen or carbon dioxide and their application in combination with flow-injection analysis to the determination of glutamate // *Anal. Chim. Acta*, 248, pp. 351-359 (1991).
- [3]. W. Vahien, J. Bradley, U. Bilitewski, R.D. Schmid. Mediated enzyme electrode for the determination of L-glutamate // *Anal. Lett.*, 24, pp.1445-1452 (1991).
- [4]. S. Ghobadi, E. Csoregi, G. Marko-Varga, L. Gorton. Bienzyme carbon paste electrodes for L-glutamate determination // *Curr. Sepr.*, 14, pp. 94-102 (1996).
- [5]. N.F. Almeida, A.K. Mulchandani. A mediated amperometric enzyme electrode using tetrathiafulvalene and L-glutamate oxidase for the determination of L-glutamic acid // *Anal. Chim. Acta*, 282, pp. 353-361 (1993).
- [6]. S.V. Vercelotti, M.A. Clarke. Comparison of modern and traditional methods of sugar analysis // *Int. Sugar J.*, 96, pp. 437-445 (1994).
- [7]. T. Murachi, M. Tabata. Use of a bioreactor consisting of a sequentially aligned L-glutamate dehydrogenase and L-glutamate oxidase for the determination of ammonia by chemiluminescence // *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 9, pp. 303-309 (1987).
- [8]. GOST P 51198-98 (ISO 4134-78) Meat and meat products. Method of determination of L-(+)-glutamic acid.
- [9]. S.V. Dzyadevych, O.P. Soldatkin. Naukovi ta tehnologichni zasady stvorennya miniat`urnih elektrohimichnih biosensoriv. *Naukova dumka*, K. 256 s. (2006).
- [10]. U. Wollenberger, F.W. Scheller, R. Hintsche, K. Bohm. Verfahren zur amperometrischen bestimmung von L-glutamat. *Pat. DD 272 478 A1* (1989).
- [11]. E. Walker, J. Wang, N. Hamdi, H. Monbouquette, N. Maidment. Selective detection of extracellular glutamate in brain tissue using microelectrode arrays coated with over-oxidized

polypyrrole // *Analyst*, 132, pp. 1107-1111 (2007).

[12]. C.D. Stalikas, M.I. Karayanis, S.M. Tzouwara-Karayanni. Immobilization of glutamate oxidase on non-porous glass beads. Automated flow injection system for the assay of glutamic acid in food samples and pharmaceuticals // *Analyst*, 118, pp. 723-726 (1993).

[13]. T.D. Gibson, J.R. Woodward. Enzyme stabilization. World Intellectual Property Organization, Geneva (1991).

[14]. T.D. Gibson, J.N. Hulbert, S.M. Parker, J.R. Woodward, I.J. Higgins. Extended shelf life of enzyme-based biosensors using a novel stabilization system // *Biosens. Bioelectron.*, 7, pp. 701-708 (1992).

[15]. H.Y. Kusakabe, T.F. Midorikawa, A. Kuninaka, H. Yoshino. Purification and properties of a new enzyme, L-glutamate oxidase, from *Streptomyces* sp. X-119-6, grown on wheat brain // *Agric. Biol. Chem.*, 47, pp. 1323-1328 (1983).

[16]. H.Y. Kusakabe, T.F. Midorikawa, T. Fujishima. Methods for determining L-glutamate in soy sauce with L-glutamate oxidase // *Agric. Biol. Chem.*, 48, pp. 181-184 (1984).

[17]. U. Wollenberger, F.W. Scheller, R. Renneberg, A. Boehmer, U. Wollenberger, H.-G. Mueller. Biosensor zur bestimmung von glutamat und substanzen die in glutamat umgewandelt werden // Pat. DD 257272 A1 (1988).

[18]. B.C. Ye, Q.-Sh. Li, Y.-R. Li, X.-B. Li, J.-T. Yu. L-Glutamate biosensor using a novel L-glutamate oxidase and its application to flow injection analysis system // *J. Biotechnol.*, 42, pp. 45-52 (1995).

[19]. C.Y. Chen, Y.C. Su. Amperometric L-glutamate sensor using a novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces platensis* NTU 304 // *Anal. Chim. Acta*, 243, pp. 9-15 (1991).

[20]. J.M. Cooper, D.J. Pritchard. Biomolecular sensors for neurotransmitter determination: electrochemical immobilization of glutamate oxidase at microelectrodes in a poly(O-phenylenediamine) film // *J. Mater. Sci. Mat. Electron.*, 5, pp. 111-116 (1994).

[21]. Y. Hu, K.M. Mitchell, F.N. Albahadily, E.K. Michaelis, G.S. Wilson. Direct measurement of glutamate release in the brain using a dual enzyme-based electrochemical sensor // *Brain Res.*, 659, pp. 117-125 (1994).

[22]. S.C. Kelly, P.J. O'Connell, C.K. O'Sullivan, G.G. Guilbault. Development of an interferent free amperometric biosensor for determination of L-lysine in food // *Anal. Chim. Acta*, 412, pp. 111-119 (2000).

[23]. S.J. Killoran, R.D. O'Neill. Characterization of permselective coatings electrosynthesized on Pt-Ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications // *Electrochim. Acta*, 53, pp. 7303-7312 (2008).

[24]. I.S. Kucherenko, D.Yu. Didukh, O.O. Soldatkin, A.P. Soldatkin. Amperometric biosensor system for simultaneous determination of adenosine-5'-triphosphate and glucose // *Anal. Chem.*, 86, pp. 5455-5462 (2014).

Стаття надійшла до редакції 19.01.2015 р.