

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 577.151.4+543.555+577.15.08

ВИКОРИСТАННЯ СИЛІКАЛІТІВ З РІЗНИМ РОЗМІРОМ ЧАСТИНОК ПРИ СТВОРЕННІ ФЕРМЕНТНИХ КОНДУКТОМЕТРИЧНИХ БІОСЕНСОРІВ

*І. С. Кучеренко^{1,2}, О. О. Солдаткін^{1,2}, Б. Озансой Касап³, Б. Аката³, О. П. Солдаткін^{1,2},
С. В. Дзядевич^{1,2}*

¹Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, вул. Заболотного, 150, 03680, м.
Київ, Україна, *e-mail*: kucherenko.i.s@gmail.com

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

³Близькосхідний технічний університет, 06531, Анкара, Туреччина

ВИКОРИСТАННЯ СИЛІКАЛІТІВ З РІЗНИМ РОЗМІРОМ ЧАСТИНОК ПРИ СТВОРЕННІ ФЕРМЕНТНИХ КОНДУКТОМЕТРИЧНИХ БІОСЕНСОРІВ

*І. С. Кучеренко, О. О. Солдаткін, Б. Озансой Касап, Б. Аката, О. П. Солдаткін,
С. В. Дзядевич*

Анотація. В роботі було перевірено можливість створення біосенсорів шляхом адсорбції ферментів (уреази та глюкозооксидази) на мікрочастинках силікалітів. Для дослідів було обрано кілька варіантів силікалітів з різним розміром кристалів, а також цеоліт типу L та мезопористі кремнієві сфери. Частинки наносили на поверхню кондуктометричних перетворювачів, після чого проводили адсорбцію згаданих ферментів. Також, для порівняння, уреазу ко-імобілізували разом з силікалітами під час ковалентного зшивання глутаровим альдегідом. В якості контроль-ного методу іммобілізації виступав метод ковалентного зшивання цих же ферментів глутаровим альдегідом. Встановлено, що всі використані мікрочастинки можуть використовуватись як адсорбенти (з різною ефективністю); найкращі показники показали біосенсори на основі силікаліту (з розміром частинок 450 нм) та мезопористих кремнієвих сфер.

Ключові слова: біосенсор, уреаза, глюкозооксидаза, силікаліт, цеоліт, мезопористі кремнієві сфери

APPLICATION OF SILICALITES WITH DIFFERENT PARTICLE DIMENSIONS DURING DEVELOPMENT OF ENZYME-BASED CONDUCTOMETRIC BIOSENSORS

I. S. Kucherenko, O. O. Soldatkin, B. O. Kasap, B. Akata, A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych

Abstract. A possibility of biosensor creation by adsorption of enzymes (urease and glucose oxidase) on silicalite microparticles was investigated. Several variants of silicalites with different particle dimensions as well as zeolite L and mesoporous silica spheres were chosen for experiments. Surface of conductometric transducers was modified with microparticles and then the enzymes were adsorbed. For comparison, urease was co-immobilized with silicalites during covalent binding by glutaraldehyde. As a control method of immobilization we used method of covalent binding of the enzymes by glutaraldehyde (without microparticles). It was shown that all tested microparticles can serve as adsorbents (with different effectiveness); best results showed biosensors based on silicalite (with particle size 450 nm) and mesoporous silica spheres.

Keywords: biosensor, urease, glucose oxidase, silicalite, zeolite, mesoporous silica spheres

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИЛИКАЛИТОВ С РАЗНЫМ РАЗМЕРОМ ЧАСТИЦ ПРИ СОЗДАНИИ ФЕРМЕНТНЫХ КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ

И.С. Кучеренко, О.О. Солдаткин, Б. Озансой Касап, Б. Аката, А.П. Солдаткин, С.В. Дзядевич

Аннотация. В работе была проверена возможность создания биосенсоров путем адсорбции ферментов (уреазы и глюкозооксидазы) на микрочастицах силикалитов. Для экспериментов было выбрано несколько вариантов силикалитов с разным размером кристаллов, а также цеолит типа L и мезопористые кремниевые сферы. Частицы наносили на поверхность кондуктометрических преобразователей, после чего проводили адсорбцию упомянутых ферментов. Также, для сравнения, уреазу ко-иммобилизировали вместе с силикалитами во время ковалентной сшивки глутаровым альдегидом. В качестве контрольного метода использовался метод ковалентной сшивки этих же ферментов глутаровым альдегидом. Установлено, что все использованные микрочастицы могут выступать как адсорбенты (с разной эффективностью); самые лучшие показатели имели биосенсоры на основе силикалита (с размером частиц 450 нм) и мезопористых кремниевых сфер.

Ключевые слова: биосенсор, уреазы, глюкозооксидаза, силикалит, цеолит, мезопористые кремниевые сферы

1. Вступ

Імобілізація біологічного матеріалу на поверхню перетворювачів є одним із важливих етапів при створенні біосенсорів, від якого прямо залежить ефективність роботи розроблених біосенсорів. Зокрема, процес іммобілізації біоматеріалу впливає на майже всі аналітичні характеристики біосенсора (величину відгуку, форму калібрувальних кривих, чутли-

вість, лінійний діапазон роботи, рівень шуму, відтворюваність та операційну стабільність сигналу тощо) [1]. З цієї причини, вдосконалення методів іммобілізації біоматеріалу було і залишається актуальним завданням біосенсористики [2].

При розробці ферментних біосенсорів використовують низку методів іммобілізації: адсорбцію на певному носії, захват ферментів у полімерну матрицю, включення їх до полііон-

них комплексів, тощо [3]. Одним з найпростіших та найбільш толерантних до біоматеріалу методів іммобілізації є метод адсорбції ферментів на певному носії. Цей метод є дешевим і простим у виконанні, проте через потребу у використанні великої кількості ферментів та поступове вимивання ферментів у робочий розчин, стандартна адсорбція не вважається оптимальним методом іммобілізації [4].

В якості адсорбентів для ферментів можуть виступати матеріали, які містять на своїй поверхні багато функціональних груп; ці групи потрібні для численних зв'язків між матеріалом та ферментом. Нові можливості для оптимізації методів адсорбції відкриваються завдяки швидкому прогресу в галузі синтезу мікрота наночастинок з заданими властивостями. Мезопористі матеріали мають велику площу поверхні кристалу та можуть нести різноманітні хімічні групи, які можуть бути корисними при іммобілізації біоматеріалу [5]. Зокрема, до таких мезопористих мікрочастинок належать силікаліти та мезопористі кремнієві сфери (МКС), які і були використані в даній роботі; для порівняння був використаний мікропористий цеоліт L.

Загальною властивістю мікрочастинок, використаних в даній роботі, є високо впорядкована структура із складною системою пор та каналів, в основі якої лежить кристалічна ґратка. Це значно збільшує площу поверхні кристалу, на якій можуть адсорбуватися ферменти. Кристалічна ґратка силікалітів складається з атомів силіцію та кисню; цеоліти мають схожу структуру, однак до їх складу входять також атоми алюмінію. До цікавих властивостей цих матеріалів, крім великої площі поверхні, можна віднести хімічну стійкість, толерантність до мікроорганізмів, можливість модифікації поверхні кристалів різноманітними хімічними групами; ці властивості роблять їх гарними адсорбентами [6-8].

Метою даної роботи була перевірка можливості використання силікалітів з різним розміром кристалів, цеоліту типу L та МКС в якості адсорбентів при створенні ферментних кондуктометричних біосенсорів.

В якості досліджуваних ферментів були обрані уреаза та глюкозооксидаза. Це одні з найбільш широко застосованих в біосенсоричі ферментів, характеристики яких добре вивчені. Біосенсори на основі уреазы застосовується в медицині для визначення вмісту сечовини в крові та сечі, а також потенційно можуть використовуватись в харчовій хімії та екологічному моніторингу важких металів [9]. Глюкозооксидаза успішно застосовується в комерційних біосенсорах для визначення вмісту глюкози в крові, також глюкозооксидаза використовується як складовий компонент ферментних систем для визначення різноманітних речовин (зокрема, дисахаридів та АТФ) [1, 10, 11].

2. Матеріали і методи

2.1. Матеріали

В роботі було використано ферменти уреазы (ЕС 3.5.1.5) із *Canavalia ensiformis* з активністю 66.3 од.акт./мг фірми «Fluka» (Швейцарія) та глюкозооксидазу (ГОД, ЕС 1.1.3.4) із *Penicillium vitale* з активністю 130 од.акт./мг фірми «Діагностикум» (Львів). Бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V) та 50% водний розчин глутарового альдегіду (ГА) було отримано від фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина). Сполуки для приготування буферів та інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «х.ч.» та «ч.д.а.».

2.2. Синтез та властивості мезопористих мікрочастинок

2.2.1. Синтез силікаліту з розміром кристалів 450 нм

Вихідний гель для синтезу містив вихідні речовини у наступних молярних співвідношеннях: ТРАОН : 5 TEOS : 500 H₂O. Тетраетилортосилікат (TEOS) виступав джерелом кремнію, тетрапропіламонію гідрохлорид (ТРАОН) виступав як шаблон. Суміш перемішували за кімнатної температури протягом

6 годин, після чого ставили в термостат на 18 годин при 125 °С. Отримані тверді частинки центрифугували при 13000 об./хв., відмивали деіонізованою водою та висушували при 80 °С

2.2.2. Синтез силікаліту з розміром кристалів 160 нм

Гель, що використовувався для синтезу силікаліту, містив вихідні речовини у наступних молярних співвідношеннях: 4ТРАОН: 25 SiO₂: 480 H₂O:100EtOH. Після гідролізу TEOS за допомогою розчину ТРАОН та 1 доби перемішування за кімнатної температури був отриманий чистий гомогенний розчин. Кристалізація розчину проводилась за температури 98 °С протягом 20 годин. Після цього, силікаліт був відділений від непрореагувавших компонентів шляхом центрифугування. Потім зразки були кальциновані на повітрі за температури 600 °С протягом 10 годин. Кінцевий продукт був отриманий після обробки кристалів ультразвуком в ультразвуковій бані з етанолом та послідовного висушування за кімнатної температури.

2.2.3. Синтез силікаліту з розміром кристалів 80 нм

Гель, що використовувався для синтезу силікаліту, містив вихідні речовини у наступних молярних співвідношеннях: 9ТРАОН:25SiO₂:408H₂O:100EtOH. Розчин для синтезу був отриманий шляхом використання TEOS, ТРАОН та деіонізованої води і витримувався 1 добу за кімнатної температури. Кристалізація розчину відбувалась при 90 °С протягом 20 годин, чистий силікаліт отримували після центрифугування з деіонізованою водою при 20000 об./хв. Потім продукт був кальцинований на повітрі за температури 600 °С протягом 10 годин.

2.2.4. Синтез мезопористих кремнієвих сфер

Молярний склад МКС становив 1,5Na₂SiO₃: 1СТАВr:361H₂O:7,4СН₃СООС₂H₅. Вихідний розчин був отриманий розчиненням цетилтриметиламмонію броміду (СТАВr) та метасилікату натрію (Na₂SiO₃) в деіонізованій воді з наступним швидким додаванням етилацетату (СН₃СООС₂H₅) за постійного перемішування. Дозрівання розчину проводили за кімнатної температури протягом 5 годин в тефлоновому автоклаві. Гідротермальну обробку проводили за 90 °С протягом 50 годин без перемішування. Отриманий продукт відмивали в деіонізованій воді та етанолі, після чого проводили фільтрування та кальцинування за 600 °С протягом 8 годин.

2.2.5. Синтез цеоліту L

Молярний склад цеоліту L становив Al₂O₃:20SiO₂:10,9K₂O:1030H₂O. Для синтезу використовували два вихідні розчини. Перший розчин містив КОН, деіонізовану воду та гідратований сульфат алюмінію, які перемішували протягом 1 години. Другий розчин містив Ludox HS-40 та деіонізовану воду. Кінцевий прозорий розчин КОН змішували з розчином Ludox при інтенсивному перемішуванні. Після дозрівання протягом 16 годин із перемішуванням, розчин ставав мутним. Гідротермальну обробку проводили за 180 °С протягом трьох діб у тефлоновому автоклаві. Отриманий продукт фільтрували та відмивали в деіонізованій воді та проводили кальцинування за 600 °С протягом 8 годин.

2.2.6. Характеристики мікрочастинок

Розмір та морфологія частинок досліджували за допомогою скануючого мікроскопу FEI QUANTA 400F. Чистота зразків та властивості кристалів визначали за допомогою дифракції рентгенівських променів (XRD). Структуру та розміри мікрочастинок, використаних в роботі, було підтверджено XRD діаграмами. Для

визначення площі поверхні та розміру пор у кристалах мікрочастинок були проведені експерименти із адсорбції/десорбції нітрогену, використовуючи аналізатор Quantachrome Corporation Autosorb-6. Поверхнева площа мікрочастинок була визначена за допомогою «multipoint BET». Узагальнені дані стосовно властивостей мікрочастинок, використаних в даній роботі, наведені в табл. 1.

Таблиця 1.

Характеристики мікрочастинок.

Мікрочастинка	Розмір частинок (мкм)	Площа поверхні (м ² /г)	Об'єм пор (сс/г)	Діаметр пор (Å)
силікаліт (450 нм)	0,45	281,7	2,014	5,221
силікаліт (160 нм)	0,16	502,4	0,2076	13,5
силікаліт (80 нм)	0,08	331,9	0,1373	9,5
МКС	4,5	483,5	2,005	176,5
цеоліт L	7	293,7	0,1198	12,0

2.3. Кондуктометричні перетворювачі

В роботі використовували кондуктометричні перетворювачі, виготовлені згідно наших рекомендацій в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова (м. Київ, Україна). Вони мають розмір 5 мм х 30 мм та складаються з двох ідентичних пар золотих гребінчастих електродів, нанесених на керамічну основу. Чутлива область кожної пари електродів складається із 20 пар растрових електродів, що мають ширину та зазор між ними 20 мкм із загальною площею чутливої поверхні біля 2 мм². Загальний вигляд перетворювачів показаний в роботі [12]. Кондуктометричні перетворювачі під'єднувались до вимірювальної установки, яка детально описана в попередній роботі [13].

2.4. Виготовлення біоселективних елементів

Для виготовлення біоселективних елементів біосенсорів використовували 3 методики іммобілізації ферментів: адсорбцію на мікрочастинках, іммобілізацію в насичених парах глутарового альдегіду, та ко-іммобілізацію мікрочастинок і ферментів в насичених парах ГА.

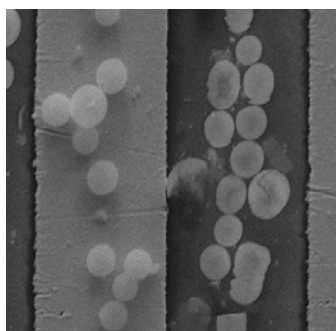
2.4.1. Адсорбція уреазы та ГОД на мікрочастинках

Для виготовлення біоселективних елементів шляхом адсорбції ферментів на мікрочастинках використовували наступну методику. Спочатку на активні області перетворювачів наносили по 0,165 мкл 10% суспензії мікрочастинок у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,75 (попередньо розчин піддавали дії ультразвуку для запобігання агрегації та рівномірного розподілення мікрочастинок), а потім перетворювачі ставили на електричну пічку, нагріту до 150 °С на 6 хв. В окремих випадках цю процедуру повторювали 2 рази для збільшення кількості мікрочастинок на перетворювачах. Після цього на робочих областях перетворювачів формувалася шар мікрочастинок (рис. 1). На одну чутливу область перетворювача наносили 0,15 мкл 5% розчину ферменту (уреазы або ГОД) у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,75, а на іншу область (референтну) – 0,15 мкл 5% розчину БСА у такому ж буфері. Після цього перетворювачі залишали на повітрі за кімнатної температури для адсорбції ферментів та БСА на мікрочастинках; час адсорбції становив 17 хв., цього вистачало для повного висихання чутливих областей перетворювачів.

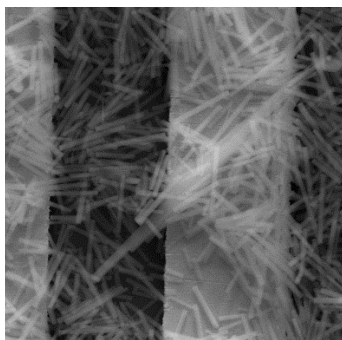
2.4.2. Іммобілізація ферментів у парах глутарового альдегіду

Для виготовлення робочих біоселективних мембран шляхом іммобілізації ферментів в насичених парах ГА використовували наступний розчин: 5% ГОД, 5% БСА, 10% гліцеролу у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,75 (або 10%

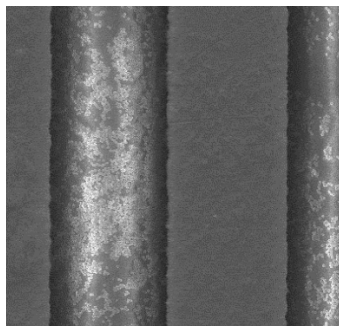
уреази, 10% БСА, 10% глицеролу в такому ж буфері). Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ферментів брали тільки БСА з кінцевою концентрацією 10% для біосенсора на основі ГОД або 20% для біосенсора на основі уреази (таким чином, і робоча, і референтна мембрани мали однаковий вміст білку). Суміші для робочих і референтних мембран наносили на відповідні чутливі області кондуктометричних перетворювачів, одразу після чого перетворювачі ставили у насичені пари ГА на 30 хв., а потім висушували протягом 15 хв. на повітрі за кімнатної температури.



А



Б



В

Рис. 1. Гребінчасті електроди з нанесеними мікрочастинками: А – МКС, Б – цеоліт L, В – силікаліт з розміром частинок 450 нм (фотографії отримані за допомогою скануючого електронного мікроскопу)

2.4.3. Ко-іммобілізація уреази та мікрочастинок у парах глутарового альдегіду

Для виготовлення біоселективних елементів шляхом ко-іммобілізації мікрочастинок і уреази в насичених парах ГА, була використана методика, аналогічна до попередньої. Єдина відмінність полягала в тому, що розчин ферменту для робочої мембрани (10% уреази, 10% БСА, 10% глицеролу у 20 мМ Ф.Б., рН 6,75) або розчин БСА для референтної мембрани (20% БСА та 10% глицеролу у такому ж буфері) змішували з 10% розчином мікрочастинок у пропорції 1:1, наносили на відповідні чутливі області перетворювачів, одразу після чого перетворювачі ставили у насичені пари ГА на 30 хв., а потім висушували протягом 15 хв. на повітрі за кімнатної температури.

Після іммобілізації біоселективних елементів (за будь-якої методики), біосенсори занурювали у робочий буфер на 30 хв. для вимірювання незв'язаних компонентів біомембран.

2.5. Методика вимірювання

Виміри проводились у 5 мМ фосфатному буфері ($\text{KH}_2\text{PO}_4 - \text{NaOH}$) з рН 6,75 за кімнатної температури у відкритій комірці об'ємом 2 мл при постійному перемішуванні. Концентрації субстратів в комірці задавали додаванням до робочої комірки аліквот концентрованих розчинів субстратів. Усі дослідження проводились щонайменше у трьох повторностях. Неспецифічні зміни сигналу біосенсора, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища, тощо, подавлялися завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань.

3. Результати та їх обговорення

Першим етапом роботи була розробка біосенсорів на основі уреази. В основі роботи цих біосенсорів лежить ферментативна реакція, що відбувається в мембрані, нанесеній на поверхню гребінчастих електродів:

Уреаза



В даній реакції відбувається зміна концентрації заряджених речовин (іонів); це приводить до зміни провідності розчину, яка реєструється кондуктометричним перетворювачем [14].

Завданням першого етапу роботи була адсорбція уреаз на різних видах мікрочастинок з метою вибрати найкращий адсорбент для створення біосенсорів. В експериментах були застосовані силікаліти з середніми розмірами кристалів 80, 160 та 450 нм, а також цеоліт типу L та мезопористі мікрочастинки МКС. Мікрочастинки наносили на декілька перетворювачів, після чого адсорбували уреазу за методикою, описаною в п. 2.4.1. Після цього отримували калібрувальні криві для визначення сечовини, наведені на рис. 2. Калібрувальні криві біосенсорів на основі адсорбованої уреазу було порівняно з калібрувальною кривою біосенсора на основі уреазу, іммобілізованої в насичених парах глутарового альдегіду (ця методика іммобілізації описана в п. 2.4.2). Як видно з рисунку, форма калібрувальної кривої і лінійний діапазон вимірювань були приблизно однакові у всіх біосенсорів, крім біосенсора, що використовував цеоліт типу L. Нажаль, чіткої залежності між розміром силікаліту та величиною відгуку біосенсора встановлено не було: найвищі відгуки, а отже, і найвищу чутливість, мав біосенсор на основі уреазу, адсорбованої на силікаліті з розміром частинок 450 нм; величина відгуків біосенсорів з використанням 80- та 160-нанометрових силікалітів була приблизно однакова (рис. 2).

На наступному етапі роботи було проведено ко-іммобілізацію мікрочастинок разом з уреазою в парах глутарового альдегіду (методика описана в п. 2.4.3). Фактично, при цьому уреазу була іммобілізована одночасно двома шляхами: ковалентним зшиванням за допомогою глутарового альдегіду та адсорбцією на мікрочастинок, які знаходились в розчині разом з уреазою та глутаровим альдегідом; передбачалося, що завдяки «подвійній» іммобілізації кількість іммобілізованої уреазу в

чутливій мембрані зросте, а отже, зростуть і відгуки біосенсора. Для ко-іммобілізації були вибрані цеоліт L, МКС та силікаліт з розміром частинок 450 нм (оскільки він показав найкращі результати при адсорбції уреазу). Втім, калібрувальні криві для визначення сечовини (рис. 3, криві 2-4), свідчать, що в усіх випадках методика ко-іммобілізації ферменту та мікрочастинок значно поступається звичайній методиці іммобілізації уреазу в парах ГА (крива 1). Значно нижчі відгуки біосенсора у випадку ко-іммобілізації уреазу та мікрочастинок можна пояснити тим, що наявність в біоселективній мембрані досить великих за розміром мікрочастинок створює певні перешкоди для дифузії субстрату (сечовини) всередину біоселективної мембрани (для відгуку кондуктометричного біосенсора основне значення мають саме найглибші шари мембрани, які знаходяться біля поверхні чутливих електродів). З цієї причини ко-іммобілізація уреазу та силікаліту не підходить для створення біосенсорів і не використовувалась в подальшій роботі.

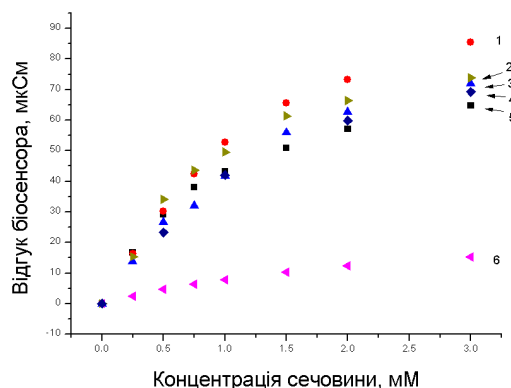


Рис. 2. Калібрувальні криві біосенсорів на основі уреазу, адсорбованої на різних мікрочастинок: силікалітах з середнім розміром частинок 450 нм (1), 80 нм (2), 160 нм (4); МКС (3) та цеоліті L (6), у порівнянні з біосенсором на основі уреазу, іммобілізованої в парах глутарового альдегіду (5). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6.75.

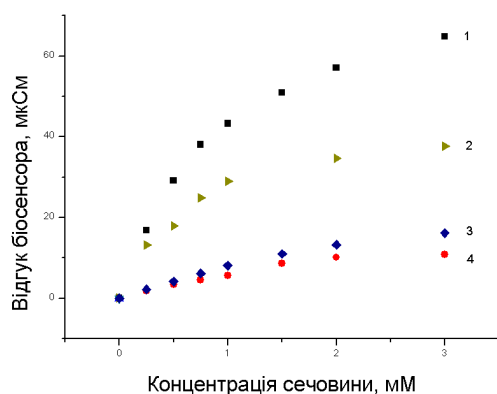


Рис. 3. Калібрувальні криві біосенсорів на основі уреазі, іммобілізованої в парах глутарового альдегіду (1) та ко-іммобілізованої в насичених парах глутарового альдегіду разом з мікрочастинками: цеолітом L (2), силікалітах з середнім розміром частинок 450 нм (3) та МКС (4). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6.75.

Важливою характеристикою будь-якого біосенсора є відтворюваність його приготування (інтер-відтворюваність відгуків), вона відображається у середньоквадратичному відхиленні відгуків біосенсорів, отриманих при різних іммобілізаціях біоселективного елементу на поверхню одного й того ж перетворювача. Цей параметр особливо важливий при виробництві великих партій біосенсорів у промислових умовах, а при лабораторній розробці біосенсорів ним часто нехтують. Так, при кількох іммобілізаціях ферментів у глутаровому альдегіді спостерігається значна розбіжність відгуків біосенсора, яка обумовлена як людським фактором (оскільки саме дослідник наносить шар розчину ферментів, з якого буде формуватись чутлива мембрана), так і випадковими змінами в умовах іммобілізації (зокрема, зміна концентрації парів ГА в залежності від умов оточуючого середовища). Оскільки адсорбція ферментів на мікрочастинках значно менше залежить від зовнішніх умов у порівнянні з іммобілізацією в насичених парах ГА, була проведена перевірка відтворюваності приготування біосенсорів шляхом адсорбції уреазі на мікрочастинках; узагальнюючі дані наведені в таблиці 2 (для порівняння використаний метод іммобілізації уреазі без мікрочастинок

в парах ГА). Як і очікувалось, відтворюваність приготування біосенсорів шляхом адсорбції на мікрочастинках була значно кращою, ніж відтворюваність біосенсорів при іммобілізації уреазі в парах ГА, що є важливою перевагою даного методу іммобілізації.

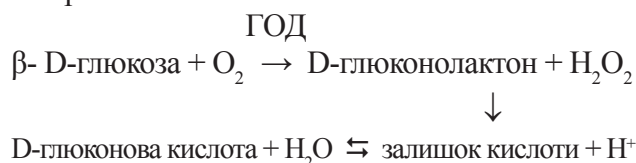
Таблиця 2.

Порівняння розбіжності відгуків біосенсорів при кількох іммобілізаціях уреазі шляхом адсорбції на мікрочастинках. Також використаний метод іммобілізації уреазі без мікрочастинок в насичених парах ГА.

Мікрочастинка, використана як адсорбент	Середньоквадратичне відхилення відгуків біосенсорів при різних іммобілізаціях біоселективного елементу, %
силікаліт (450 нм)	19
силікаліт (160 нм)	22
силікаліт (80 нм)	16
МКС	28
цеоліт L	16
іммобілізація в парах ГА	87

Отже, було показано, що цілком можливе створення біосенсорів шляхом іммобілізації уреазі на мікрочастинках, причому адсорбція уреазі на деяких силікалітах не поступалася за ефективністю поширеній методиці іммобілізації уреазі в насичених парах ГА.

Метою наступного етапу роботи було показати, що ці ж мікрочастинки можуть бути використані і для адсорбції іншого часто використовуюваного в біосенсориці ферменту – глюкозооксидази (ГОД). Цей фермент каталізує окиснення глюкози до глюконової кислоти, яка згодом дисоціює на залишок кислоти та протон:



В даній реакції відбувається утворення іонів, які приводять до підвищення провідності розчину, що і реєструється кондуктометричним перетворювачем.

Ми використали для адсорбції силікаліти з розміром частинок 450 нм, оскільки в попередній частині роботи саме він показав найкращі результати при адсорбції уреазі. Калібрувальну криву біосенсора на основі адсорбованої ГОД було порівняно з калібрувальною кривою біосенсора на основі ГОД, іммобілізованої в насичених парах глутарового альдегіду (рис. 4). Біосенсори на основі ГОД, адсорбованої на силікаліті, були придатні до використання, хоча, як видно з рисунку, вони мали вужчий лінійний діапазон роботи і нижчі відгуки на насичуючу концентрацію субстрату у порівнянні з біосенсором на основі ГОД, іммобілізованої в парах ГА.

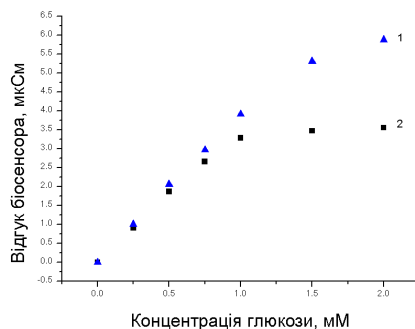


Рис. 4. Калібрувальні криві біосенсорів на основі глюкозооксидази, адсорбованої на силікаліті з середнім розміром частинок 450 нм (2), у порівнянні калібрувальною кривою біосенсора на основі глюкозооксидази, іммобілізованої в парах глутарового альдегіду (1). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6.75.

Оскільки на попередньому етапі роботи при адсорбції уреазі на силікалітах спостерігалось зменшення розбіжності відгуків біосенсора за різних іммобілізацій, було досліджено цей же параметр для біосенсора на основі ГОД. Відносно середньоквадратичне відхилення відгуків біосенсорів, отриманих при різних адсорбціях ГОД на силікаліті (з розміром частинок 450 нм) становило 25%, а у випадку іммобілізації ГОД в насичених парах

ГА цей же параметр становив 47%. Отже, як і у випадку біосенсора на основі уреазі, адсорбція ГОД на силікаліті покращує відтворюваність приготування біосенсорів.

В цілому, розробка біосенсорів на основі адсорбованих ферментів є перспективним та корисним напрямком розвитку біосенсоріки, оскільки використання цього методу іммобілізації може задовольнити ряд технологічних потреб при масовому виробництві біосенсорів.

4. Висновки

В нашій роботі була досліджена можливість ефективної адсорбції ферментів на різних типах мікрочастинок, зокрема адсорбція уреазі силікалітах з різним розміром кристалів (80, 160, 450 нм), МКС та цеоліті типу L. Показано, що найкращими характеристиками володіли біосенсори на основі уреазі, адсорбованої на силікалітах. Встановлено, що при створенні біосенсорів шляхом адсорбції ферментів на мікрочастинках, інтер-відтворюваність біосенсорів значно поліпшується, що свідчить про перспективність використання цього матеріалу. Силікаліт, на основі якого було отримано найчутливіший уреазний біосенсор, було використано для адсорбції глюкозооксидази, але створений глюкозний біосенсор поступався за характеристиками біосенсору на основі ГОД, іммобілізованої в парах глутарового альдегіду. Таким чином, запропонований нами метод адсорбції ферментів на мікрочастинках, можна з успіхом використовувати при розробці біосенсорів на основі уреазі, але він є менш задовільним при розробці біосенсорів на основі ГОД.

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

Список літератури

1. Дзядевич С.В., Солдаткін О.П., Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів.- К.: Наукова думка, 2006.- 256 с.
2. Teles F.R.R., Fonseca L.P., Applications of polymers for biomolecule immobilization in electrochemical biosensors // *Materials Science and Engineering C*.- 2008.- V. 28.- P. 1530–1543.
3. Евтюгин Г.А., Будников Г.К., Стойкова Е.Е., Основы биосенсорики.- Казань: Казанский государственный университет им. В.И. Ульянова-Ленина, 2008.- 80 с.
4. Bonnet C., Andreescu S., Marty J.-L., Adsorption: an easy and efficient immobilisation of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes // *Analytica Chimica Acta*.- 2003.- V. 481.-P. 209–211.
5. Yiu H.H.P., Wright P.A., Botting N.P., Enzyme immobilisation using SBA-15 mesoporous molecular sieves with functionalised surfaces // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*.- 2001.- V. 15.- P. 81–92.
6. Tavolaro A., Tavolaro P., Drioli E., Zeolite inorganic supports for BSA immobilization: Comparative study of several zeolite crystals and composite membranes // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*.- 2007.- V. 55.- P. 67–76.
7. Meier W.M., Olsen D.H., Atlas of Zeolite Structure Types.- New York, USA: Wiley-Interscience, 1974.
8. Liu B., Yan F., Kong J. et al., A reagentless amperometric biosensor based on the coimmobilization of horseradish peroxidase and methylene green in a modified zeolite matrix // *Analytica Chimica Acta*.- 1999.- V. 386.- P. 31-39.
9. Singh M., Verma N., Garg A. K. et al., Urea biosensors // *Sensors and Actuators B*.- 2008.- V. 134.- P. 345–351.
10. Кучеренко І.С., Солдаткін О.О., Пешкова В.М. та ін., Оптимізація кондуктометричного біосенсора на основі трьох ферментів для визначення іонів важких металів в реальних водних зразках // *Біотехнологія*.- 2009.- Т. 2.- С. 86-93.
11. Compagnone D., Guilbault G.G., Glucose oxidase/hexokinase electrode for the determination of ATP // *Analytica Chimica Acta*.-1997.- V.340.- P.109-113.
12. Soldatkin O.O., Peshkova V.M., Dzyadevych S.V. et al., Novel sucrose three-enzyme conductometric biosensor // *Materials Science and Engineering C*.-2008.- V. 28.- P. 959–964.
13. Saiapina O.Y., Pyeshkova V.M., Soldatkin O.O. et al., Conductometric enzyme biosensors based on natural zeolite clinoptilolite for urea determination // *Materials Science and Engineering: C*.- 2011.- V. 31.- P. 1490–1497.
14. Дзядевич С.В. Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування // *Біополімери і клітина*.- 2005.- Т.21.- С. 91–106.