

УДК 577.15+573.6

## КОНДУКТОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ ТРИФЕРМЕНТНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

*О. О. Солдаткін, В. М. Пешкова, С. В. Дзядевич,  
О. П. Солдаткін, Г. В. Єльська*

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,  
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна, тел. (044) 526-43-97,  
e-mail: alex\_sold@yahoo.com.

### Анотація

#### КОНДУКТОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ ТРИФЕРМЕНТНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ

*О. О. Солдаткін, В. М. Пешкова, С. В. Дзядевич, О. П. Солдаткін, Г. В. Єльська*

В роботі представлено дані щодо розробки високочутливого селективного кондуктометричного біосенсора для визначення іонів важких металів у водних розчинах. Як кондуктометричний перетворювач використовувалася диференційна пара планарних золотих гребінчастих електродів, нанесених на ситалову підкладку. Роль біоселективного елементу відіграла триферментна система (інвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза), іммобілізована на поверхню перетворювача, яка є чутливішою і селективнішою у порівнянні з іншими ферментними системами за рахунок сумарного ефекту інгібування трьох ферментів. Співвідношення ферментів в мембрані підбирали експериментально, маючи на меті досягнення найбільшої чутливості біосенсора як до субстрату (сахарози), так і до важких металів. В роботі встановлено оптимальний час інкубації біосенсора в розчині токсинів для отримання необхідної чутливості, який становив 30 хвилин. Отримано калібрувальні криві для визначення різних іонів важких металів кондуктометричним біосенсором та перевірено його селективність щодо інших груп токсинів. Розроблений біосенсор характеризується більшою чутливістю та селективністю до іонів  $Hg^{2+}$  та  $Ag^+$  у порівнянні з відомими на даний момент біосенсорами для аналізу важких металів і може бути рекомендований при експрес-аналізі реальних зразків в екологічному моніторингу.

**Ключові слова:** кондуктометричний біосенсор, інгібіторний аналіз, інвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза, важкі метали

### Abstract

#### THREE-ENZYME CONDUCTOMETRIC BIOSENSOR FOR SELECTIVE DETERMINATION OF HEAVY METAL IONS

*O. O. Soldatkin, V. M. Peshkova, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya*

The data on development of highly sensitive and selective conductometric biosensor for determination of heavy metal ions are presented. A differential pair of gold planar thin-film interdigitated electrodes deposited on the ceramic substrate was used as a conductometric transducer. As a bioselective element, the three-enzyme system (invertase, mutarotase, glucose oxidase) immobilized on the transducer surface was more sensitive and selective to heavy metal ions as compared with other enzymatic systems due to summary inhibition effect of three enzymes. The enzymes ratio in mem-

brane was chosen experimentally taking into consideration obtaining maximal biosensor sensitivity both to the substrate (sucrose) and to heavy metal ions. The optimum time of the biosensor incubation in solution of toxic compounds, required to ensure necessary sensitivity was determined to be 30 min. The calibration curves for determination of different heavy metal ions were obtained. The biosensor selectivity to other groups of toxins was studied too. The biosensor developed is characterized in high sensitivity and selectivity to  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Ag}^+$  in comparison with known biosensors for heavy metal ions analysis. Therefore it can be recommended at express analysis of heavy metals in ecological monitoring.

**Keywords:** conductometric biosensor, inhibitory analyses, invertase, mutarotase, glucose oxidase, heavy metals

## Аннотация

### КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ТРЕХФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

*А. А. Солдаткин, В. Н. Пешкова, С. В. Дзядевич, А. П. Солдаткин, А. В. Ельская*

В работе представлены данные по разработке высокочувствительного селективного кондуктометрического биосенсора для определения ионов тяжелых металлов. Как кондуктометрический преобразователь использовалась дифференциальная пара золотых планарных гребенчатых электродов, нанесенных на ситаловую подложку. Роль биоселективного элемента выполняла трехферментная система (инвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза), иммобилизованная на поверхность преобразователя. Эта трехферментная система была более чувствительна и селективна по сравнению с другими ферментными системами за счет суммарного эффекта ингибирования трех ферментов. Соотношения ферментов в мембране подбирали экспериментально, принимая во внимание достижение наибольшей чувствительности биосенсора как к субстрату (сахарозе), так и к ионам тяжелых металлов. В работе установлено оптимальное время инкубации биосенсора в растворе токсинов, которое составляло 30 минут. Получены калибровочные кривые для определения разных ионов тяжелых металлов кондуктометрическим биосенсором. Также была проверена его селективность относительно других групп токсинов. Разработанный биосенсор характеризовался высокой чувствительностью и селективностью к ионам  $\text{Hg}^{2+}$  и  $\text{Ag}^+$ , по сравнению с известными на данный момент биосенсорами для анализа тяжелых металлов. Потому он может быть использован в качестве экспресс-метода при анализе реальных образцов в экологическом мониторинге.

**Ключевые слова:** кондуктометрический биосенсор, ингибиторный анализ, инвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза, тяжелые металлы

## Вступ

В наш час екологічний моніторинг навколишнього середовища стає все більш актуальною проблемою сучасного суспільства [1]. Це пов'язано із розвитком хімічної промисловості та інтенсивним використанням різноманітних хімічних препаратів в сільському господарстві та інших галузях людської діяльності. Ці сполуки та продукти їхньої деградації можуть попадати у повітря, землю, воду, тим самим забруднюючи великі території, а потім потрапляють у питну воду та продукти харчування людей. Все

це, в свою чергу, призводить до погіршення самопочуття людей та виникнення різних захворювань [2].

Особливістю забруднень у великих населених пунктах, особливо в промислових районах, є попадання в ґрунти великої кількості сполук важких металів різного походження. Їх викиди в природне середовище відбуваються на металургійних та хімічних підприємствах через різні промислові процеси, а також в повсякденному житті через автомобільні вихлопи, каналізаційні зливи, тощо. Наприклад, у поверхневій воді

сполуки ртуті можуть поступати в результаті вилуговування порід в районі ртутних родовищ (кіновар, метациннабарит, лівінгстоніт), в процесі розкладання водних організмів, що накопичують ртуть. Значні кількості ртуті поступають у водні об'єкти із стічними водами підприємств, що виробляють пестициди, фармацевтичні препарати, деякі вибухові речовини. Джерелами надходження срібла в поверхне-

ві води є підземні води і стічні води копалень, збагачувальних фабрик, підприємств, пов'язаних з фотовиробництвом. У випадку сільськогосподарських районів основними джерелами забруднення іонами важких металів є агротехнічна промисловість. В табл. 1 наведено основні агротехнічні джерела забруднення ґрунтів та стічних вод важкими металами на територіях колишнього СРСР [3].

Таблиця 1

Агротехнічні джерела забруднення ґрунтів важкими металами, (мг/кг сухої речовини) [3]

Іони металів	Фосфорні добрива	Вапно	Азотні добрива	Органічні сполуки	Пестициди
Cd	0,1-170	0,04-0,1	0,05-8,5	0,3-0,8	-
Cu	1-300	2-125	1-15	2-60	12-50
Cr	66-245	10-15	3,2-19	5,2-55	-
Hg	0,01-1,2	0,05	0,3-2,9	0,09-0,2	0,8-42
Pb	7-225	20-1250	2-27	6,6-15	60
Ni	7-38	10-20	7-34	7,8-30	-
Zn	50-1450	10-450	1-42	15-250	1,3-25

У навколишньому середовищі важкі метали та їх сполуки характеризуються відносно високою стійкістю, розчинністю в атмосферних опадах, здатністю до сорбції ґрунтами і акумуляцією рослинами. Вони здатні накопичуватися в організмі та є отруйними для людини і тварин в будь-якому своєму стані, відрізняються широким спектром і різноманітним проявом шкідливих впливів [4].

У зв'язку з вищесказаним, постійний ефективний контроль наявності цих токсичних сполук у довкіллі та продуктах споживання є необхідним для охорони природи та покращення якості людського життя [5]. Сучасні загальноприйняті методи високоточного визначення важких металів, такі як газова та рідинна хроматографія, спектрофотометрія, різноманітні хімічні та фізичні методи, потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання [6]. Ще одним недоліком наведених методів аналізу є необхідність у складній попередній підготовці проб, що вимагає великих затрат часу та коштів. Тому сьогодні постає дуже актуальне питання створення більш зручного, швидкого та дешевого методу визначення вмісту важких металів в зразках навколишнього середовища та різноманітних продуктах харчування.

Розробка та створення чутливих та селективних біосенсорів для визначення токсичних

речовин може найкраще задовольнити усім вищезгаданим вимогам. На даний момент є декілька варіантів електрохімічних біосенсорів для визначення іонів важких металів [7,8]. Вони, в основному, базуються на використанні ферменту уреазу та зелених флуоресцентних дендримерів. Недоліками цих біосенсорів є те, що вони не є селективними для конкретного важкого металу, а можуть бути використані лише для визначення загальної токсичності зразків. Іншими прикладами біосенсорів для визначення важких металів є амперометричні сенсори на основі триферментної системи (інвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза) [9,10]. Перший варіант такого біосенсору використовував іммобілізовані на поверхню амперометричного перетворювача мутаротазу та глюкозооксидазу, інвертазу ж просто додавали у реактор разом із пробую, а це ускладнювало процедуру вимірів і збільшувало собівартість аналізу [9]. Другий варіант був більш практичним, в ньому іммобілізували всі три ферменти одразу, хоча мутаротазу використовували у невиправдано великій кількості [10].

Кондуктометричні методи аналізу є достатньо простими, зручними, точними та дозволяють вирішити ряд важливих науково-дослідних та виробничих задач [11]. Тому метою цієї роботи була розробка саме кондуктометричного біосенсора на основі триферментної системи

(глюкозооксидаза, мутаротаза та інвертаза) для визначення концентрації іонів важких металів у водних розчинах.

## Матеріали і методи

### Матеріали

У дослідженнях використовувалися препарати ліофілізованих ферментів: глюкозооксидаза (ГОД) із *Penicillium vitale* активністю 130 од.акт./мг фірми “Діагностикум” (Львів, Україна); інвертаза із пекарських дріжджів активністю 355 од.акт./мг фірми “Fluka” (Швейцарія); мутаротаза із нирки свині активністю 100 од.акт./мг фірми “Biozyme Laboratories Ltd” (Англія). Бичачий сироватковий альбумін (БСА) (фракція V) та 50%-й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) були отримані від фірми “Sigma-Aldrich Chemie” (Германия). Як субстрат використовувався розчин сахарози “ч.д.а.”. Як інгібітори використовувалися водні розчини нітратів важких металів вітчизняного виробництва та трихлорфон [(dimethyl — 2,2,2-trichlor — 1 — hydroxyethyl) — phosphonat] (фосфорорганічний пестицид фірми Riedel-de-Haen, Швейцарія); карбофуран (2,3 — dihydro — 2,2 — dimethylbenzofuran — 7 — yl N-methylcarbamate) (карбаматний пестицид фірми Riedel-de-Haen, Швейцарія). Як робочий буфер використовували фосфатний розчин ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -NaOH) фірми “Merck” (Германия). Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти “х.ч.” та “ч.д.а.”.

### Конструкція сенсора

При створенні кондуктометричних перетворювачів в якості електродного матеріалу використовуються благородні метали, а для підкладки — непровідні матеріали, наприклад скло або кераміку. Матеріал підкладки, як правило, не впливає на чутливість перетворювача. Кондуктометричні електроди найчастіше виготовляються фотолітографічним способом після термовакуумного напылення шару золота на підкладку із ситалу [12].

У роботі використано кондуктометричні перетворювачі, виготовлені згідно наших рекомендацій в Інституті фізики напівпровідників ім. Лашкарьова (м. Київ, Україна). Вони мають розмір 5×30 мм та складаються з двох іденти-

чних систем золотих гребінчастих електродів (рис. 1). Кожна така система складається із 20 пар растрових електродів, що мають ширину та зазор між ними 20 мкм із загальною площею чутливої поверхні біля 2 мм<sup>2</sup>.

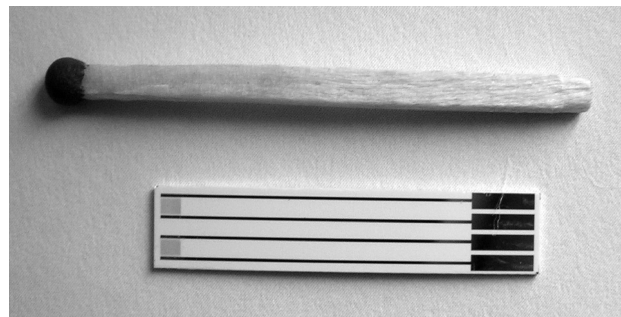


Рис. 1. Загальний вигляд кондуктометричного перетворювача з диференційною парою золотих гребінчастих електродів

### Виготовлення біоселективних елементів

Для виготовлення робочих біоселективних мембран на основі триферментної системи готували суміш з вмістом: 10% інвертаза, 10% мутаротаза, 10% глюкозооксидаза та 10% БСА. Наважки ферментів розчиняли у 40 мМ фосфатному буфері, рН 6.5 з 20% гліцерином. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ферментів брали тільки БСА, кінцева концентрація якого складала 40%. Перед нанесенням на поверхні перетворювачів приготовлені суміші (для референтної і робочих мембран) змішували з 2.5% водним розчином глутарового альдегіду у співвідношенні 1:1. Отримані розчини зразу ж наносили на робочі частини перетворювачів до повного покриття робочої поверхні кондуктометричного перетворювача, об'єм кожної із мембран складав близько 0.1 мкл. Потім мембрани висушували протягом 2 годин на повітрі за кімнатної температури. Перед початком роботи мембрани відмивали 5 мМ фосфатним буфером рН 6.5 від надлишку незв'язаного ГА.

### Схема установки та принцип вимірювання

На рис. 2 зображена блок-схема вимірювальної установки. З низькочастотного генератора сигналів ГЗ-118 змінна напруга з частотою 100 кГц та амплітудою 10 мВ подається на диференційну пару кондуктометричних електродів. Диференційний режим вимірювань засто-

сований для підвищення чутливості сенсора та мінімізації шумів за рахунок неспецифічних впливів. Електроди знаходяться в комірці з розчином, що досліджується. Отриманий на електродах сенсора сигнал знімається з опорів

навантаження  $R_n=1$  кОм та поступає через диференційний підсилювач “Unipan-233-6” на селективний нановольметр “Unipan-233”. Після вольметра цей сигнал подається на реєструючий пристрій.

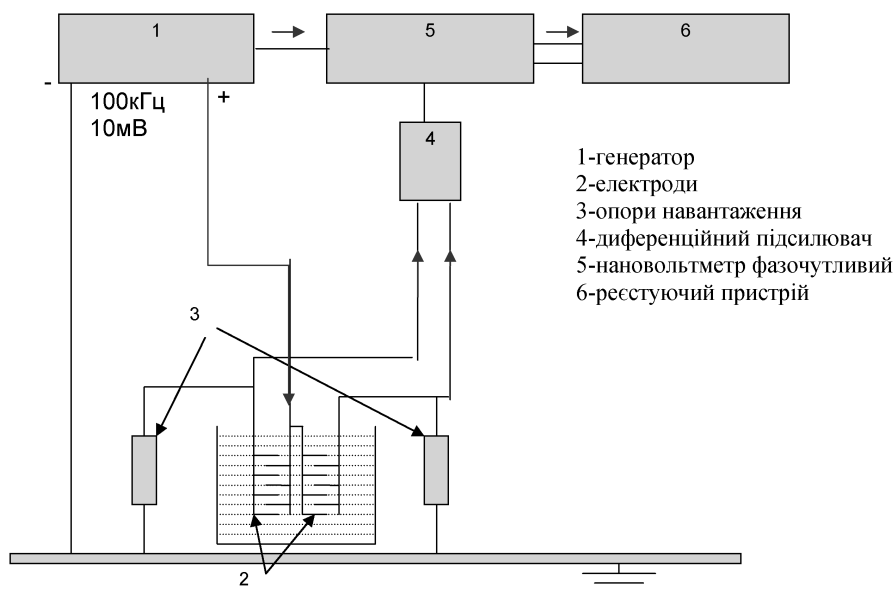


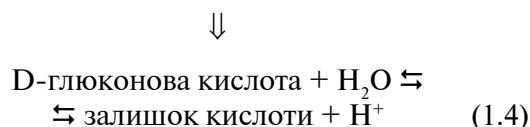
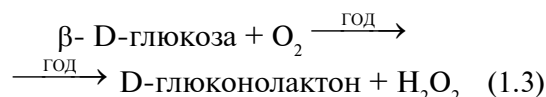
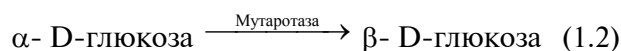
Рис. 2. Блок-схема вимірювальної установки

### Методика вимірювання

Виміри проводились у 5 мМ фосфатному буфері з  $pH=6.5$  за кімнатної температури у відкритій комірці при інтенсивному перемішуванні. Концентрацію субстрату в комірці задавали додаванням до робочого буферу порцій стандартних концентрованих вихідних розчинів субстрату. Інгибування ферментів проводили експозицією біосенсора протягом 30 хвилин в розчинах солей металів за різних концентрацій від 1 до 100 мкМ. Дослідження проводилися щонайменше у трьох серіях. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливанням температури,  $pH$  середовища, електричними завадами, подавлялися завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань.

### Результати та їх обговорення

В основі роботи біоселективного елементу розробленого кондуктометричного біосенсора лежить такий каскад ферментативних реакцій:



Інвертаза, мутаротаза і глюкозооксидаза поетапно розщеплюють сахарозу до перекису водню та D-глюконолактону. Глюконолактон в свою чергу спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, яка дисоціює на залишок кислоти і протон, при цьому змінюється провідність розчину, яку і можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача [11]. Далі необхідно провести інкубацію біосенсора в аналізованому розчині з можливим вмістом в ньому іонів важких металів. В ході цієї інкубації іони важких металів будуть інгибувати ферменти, при цьому деякі іони металів можуть інгибувати один чи два ферменти, а інші — всю триферментну систему. Це може призвести до підвищення чутливості біосенсора до певних іонів металів або розширення їх спектру визначення (у порівнянні із моно-ферментними

сенсорами, наприклад, на основі глюкозооксидази). Тому після інгібування ферментів в ході каскаду реакцій генерується менша кількість протонів, що призводить до зменшення відгуку. В залежності від різниці величин відгуків до і після інгібування визначають наявність іонів важких металів в досліджуваному зразку.

На рис. 3 наведено типову схему проведення інгібіторного аналізу на прикладі визначення іонів  $Hg^{2+}$ . За допомогою біосенсора отримували початковий сигнал ( $X$ ) на внесення до комірки сахарози в концентрації 1 мМ. Величину цього сигналу приймаємо за 100%. Потім біо-

сенсор розміщували у розчині з умовно невідомою концентрацією іонів  $Hg^{2+}$  на 30 хвилин. Після інкубації біосенсор відмивали від залишків іонів ртуті та знову отримували сигнал біосенсора ( $Y$ ) на внесення до комірки тієї ж концентрації сахарози. В залежності від величини сигналів отримували залишкову активність  $Z$  по формулі  $Z=Y*100/X$ , де  $X, Y$  — величини сигналів біосенсора до і після інкубації його в розчині з іонами ртуті, відповідно. У разі незначного ( $\leq 10\%$ ) зменшення активності біосенсора при 100 мкМ концентрації інгібітора наступні експерименти з цим металом не проводились.

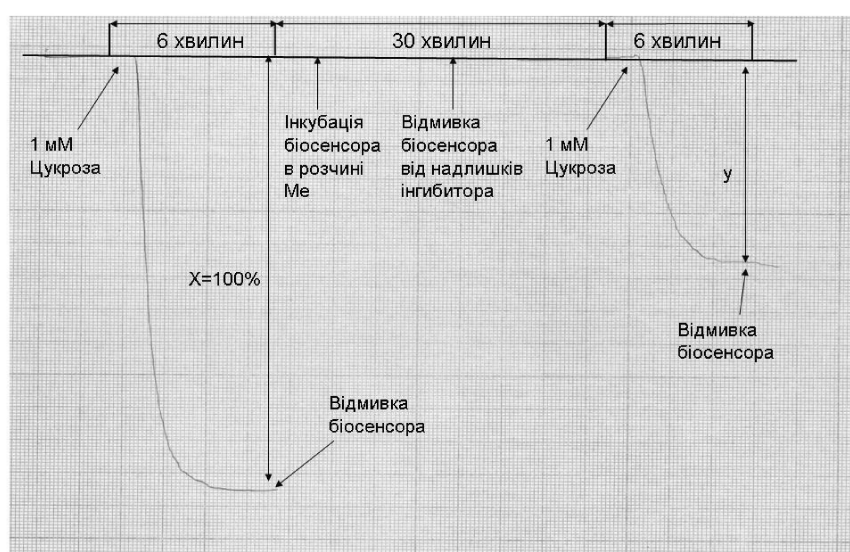


Рис.3 Схема інгібіторного визначення іонів важких металів за допомогою кондуктометричного сахарозного біосенсора

Робочі характеристики кондуктометричного біосенсора залежать від складу біоселективної мембрани та методу іммобілізації ферментів. Наприклад, величина відгуку біосенсора на сахарозу залежить не тільки від активності відповідних ферментів та дифузійних процесів в біоселективній мембрані, а й від співвідношення цих ферментів в мембрані біосенсора. Також по різниці відгуків біосенсора на глюкозу та сахарозу можна аналізувати, який фермент у складі мембрани знаходиться у надлишку, а якого недостатньо для досягнення найбільшої чутливості сенсора до субстрату. Із використаних для створення біосенсора ферментів інвертаза є найбільш чутливим ферментом до іонів важких металів [9,10]. Тому наступним етапом роботи при створенні біосенсора була оптимізація ферментного складу біоселективної мембрани для визначення субстрату, при якому чутливість була б

найбільшою, а співвідношення ферментів було б із надлишком глюкозооксидази та мутаротази і недостатньою для перетворення всього субстрату кількістю інвертази, як самого чутливого до токсинів ферменту [10]. Спочатку підбирався оптимальний процентний вміст мутаротази в складі ферментної мембрани. Для цього окремо готувалися суміші ГОД та мутаротази в 40 мМ фосфатному буфері (рН 6.5) з 20% гліцерином, концентрація ГОД була сталою і складала 10%, в той час як мутаротазу брали в різних концентраціях. При змішуванні гелів в пропорції 1:1 з водним розчином глутарового альдегіду, концентрація ГОД в робочій мембрані складала 5%, а концентрація мутаротази варіювалася. Вказана концентрація ГОД була вибрана згідно даних роботи [13], в якій було показано, що вона є оптимальною для визначення глюкози, оскільки саме при таких параметрах ми маємо оптималь-

не співвідношення чутливості та динамічного діапазону роботи сенсора. Перед проведенням вимірів в робочу комірку вносились інвертаза у надлишку, тобто із кінцевою концентрацією в 100 разів більше, ніж теоретично необхідно. Потім отримували ряд відгуків біосенсора на 1 мМ глюкозу та 1 мМ сахарозу. При цьому за 100% був обраний відгук біосенсора на 1 мМ глюкозу. З рис. 4 видно, що при концентрації мутаротази в біоселективній мембрані 4% та вище, відгуки біосенсора на глюкозу та сахарозу набувають однакового значення, тому у подальших дослідженнях була використана концентрація мутаротази в мембрані 5%.

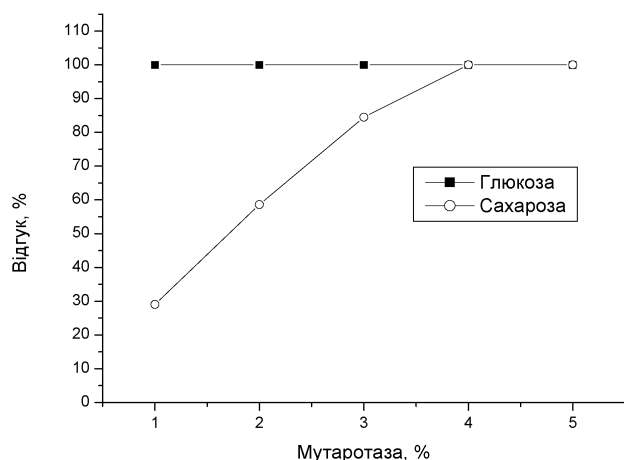


Рис. 4. Залежність величин відгуків біосенсора на глюкозу та сахарозу від вмісту мутаротази в складі ферментної мембрани. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6.5, концентрація субстрату 1 мМ

Наступним етапом оптимізації ферментного складу мембрани біосенсору був підбір оптимальної концентрації інвертази в складі ферментної мембрани. Для цього створювали гелі з різною концентрацією інвертази. До складу гелів входили ферменти мутаротаза та ГОД у постійній концентрації 10 % для кожного ферменту, що забезпечило концентрацію цих ферментів у мембрані — 5%. З рис. 5 видно, що при збільшенні вмісту інвертази в складі ферментної мембрани до 8% різниця відгуків сенсора на глюкозу та сахарозу є найменшою, що, відповідно, свідчить про максимальне насичення мембрани інвертазою. Оскільки нам необхідно, щоб інвертаза в біоселективній мембрані була задіяна у перетворенні сахарози у повному обсязі, то в подальшому для приготування ферментної мембрани при створенні біосенсора використовувалась інвертаза у кінцевій концентрації 5%.

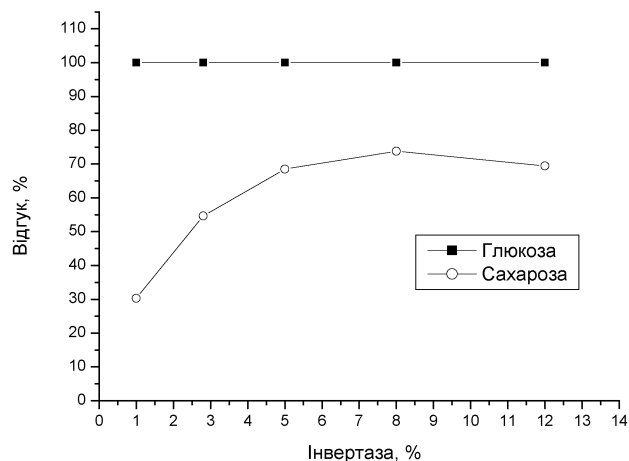


Рис. 5. Залежність величини відгуків біосенсора на глюкозу та сахарозу від вмісту інвертази в складі ферментної мембрани. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6.5, концентрація субстрату 1 мМ

Таким чином було оптимізовано концентрації ферментів в біоселективній мембрані, які склали 5% для інвертази, 5% для мутаротази, і 5% для ГОД.

Крім того, для найкращої чутливості розробленого біосенсора до іонів важких металів необхідно було визначити оптимальну концентрацію сахарози, як субстрату. Теоретично оптимальна концентрація субстрату повинна знаходитися в області насичення ферменту субстратом, коли кожна з молекул ферментів максимально задіяна в процесах перетворення субстрату до кінцевого продукту, який призводить до зміни провідності і генерує максимальний відгук. Для визначення оптимальної концентрації субстрату в інгібіторному аналізі було проведено дослідження залежності величини відгуків біосенсора від концентрації сахарози до і після інгібування його 50 мкМ розчином  $Hg^{2+}$  (рис. 6). З рисунку видно, що при збільшенні концентрації сахарози до 1.0 мМ ми маємо класичну залежність відгуків та незалежність рівня інгібування від концентрації субстрату. При подальшому збільшенні концентрації субстрату від 1.0 мМ до 1.5 мМ, відгук продовжує зростати виходячи на насичення (за різних концентрацій субстрату для біосенсора до і після інгібування), але при цьому починає зменшуватись рівень інгібування. Тому в подальших експериментах було вирішено використовувати концентрацію субстрату 1.5 мМ сахарози, при якій спостерігається найбільший відгук біосенсору на сахарозу та залишається досить

високий рівень інгібування (тобто чутливість до важких металів).

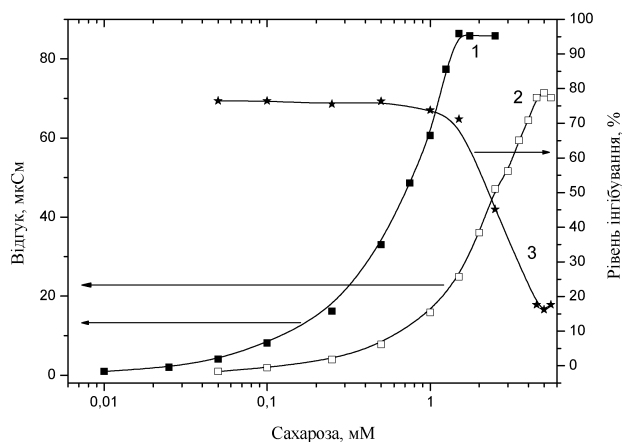


Рис. 6. Залежність величин відгуків біосенсора до його інкубації у 50 мкМ розчині ртуті (1) і після неї (2) від концентрації сахарози, та крива рівня інгібування триферментної системи біоселективного елемента від концентрації сахарози (3). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6.5, час інгібування 30 хв

Важливе значення при визначенні концентрацій токсинів відіграє час інкубації біосенсора у розчині, який досліджується. Результати аналізу залишкової активності біоселективного елемента на основі триферментної системи в залежності від часу інгібування представлені на рис. 7. Як видно з графіку, найбільш інтенсивно процес інгібування протікає в перші 30 хвилин, залишкова активність ферментної системи біоселективного елемента складає біля 25 % від початкової, потім швидкість інгібування значно зменшується. При експозиції біосенсора у розчині інгібітору протягом години залишкова активність триферментної системи складає близько 10 %. Це свідчить про те, що для визначення дуже малих концентрацій токсину необхідно збільшувати час інгібування, відповідно і загальний час проведення аналізу. Отже потрібно вибрати компромісні умови визначення, за яких при відносно невеликому часі інгібування є можливість визначення достатньо низьких концентрацій токсинів. Тому для подальшої роботи ми вибрали час інкубації у розчині токсинів 30 хвилин.

Враховуючи отримані вище дані, подальші дослідження ми проводили з використанням 5 мМ фосфатного робочого буферу з рН 6.5, концентрації сахарози 1.5 мМ та часу інгібування 30 хв. Криві залежності залишкової активності

триферментної системи біосенсора від концентрації іонів різних важких металів представлені на рис. 8. Як видно, найбільший вплив на активність ферментів мали іони  $\text{Ag}^+$  та  $\text{Hg}^{2+}$ . Інші важкі метали при їх концентраціях до 100 мкМ лише незначною мірою впливали на роботу ферментативної системи. Аналізуючи отримані криві, можна зробити висновок, що триферментна система на основі глюкозооксидази, інвертази та мутаротази може досить ефективно використовуватись для високочутливого та селективного аналізу іонів ртуті та срібла.

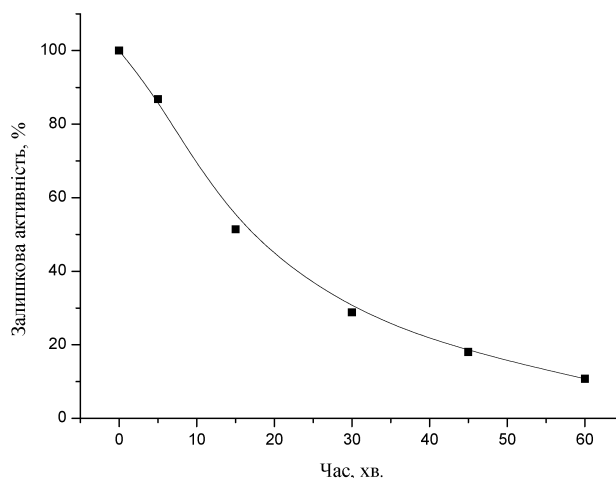


Рис. 7. Залежність залишкової активності триферментної системи біосенсора від часу інкубації біосенсора в розчині інгібітору. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6.5, концентрація субстрату — 1.5 мМ сахарози, концентрація інгібітору — 50 мкМ  $\text{Hg}^{2+}$

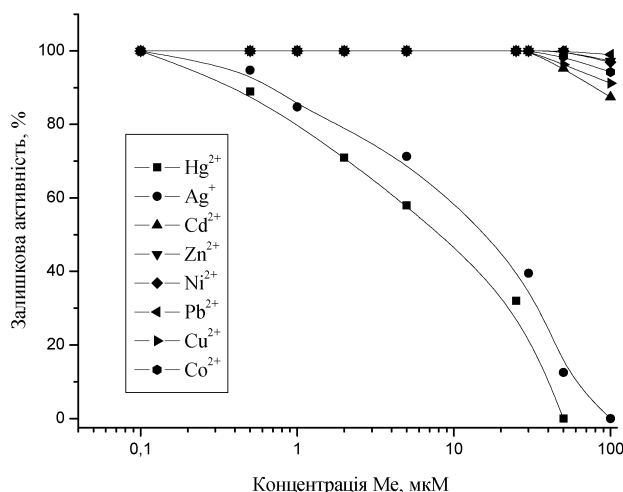


Рис. 8. Залежність залишкової активності триферментної системи біосенсора від концентрації іонів різних металів. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6.5, концентрація сахарози — 1.5 мМ, час інгібування 30 хв



Наступним етапом нашої роботи була перевірка селективності розробленого кондуктометричного біосенсора на основі триферментної системи до різних груп токсинів, які можуть бути присутні в реальних зразках. В табл. 2 представлено залежність рівня інгібування біосенсора на основі триферментної системи від 1 мМ концентрації різних токсичних речовин, причому за 100% інгібування було прийнято

інгібування біосенсора 100 мкМ концентрацією нітрату ртуті. Як видно з табл. 2, наявність у розчині формальдегіду, пестицидів та гербіцидів в 1 мМ концентрації ніяк не впливало відгук сенсора, а в окремих випадках (наприклад, трихлорфон) ми могли бачити навіть невелике збільшення відгуку біосенсора. Це свідчить про високу селективність розробленого біосенсора відносно інших груп токсинів.

Таблиця 2

Перевірка впливу різних груп токсинів на роботу триферментної системи

Токсини	Концентрація речовини, мМ	Рівень інгібування, %
Іони важких металів ( $\text{Ag}^+$ , $\text{Hg}^{2+}$ )	0.1	100
Пестициди (трихлорфон)	1	-10
Гербіциди (карбофуран)	1	0
Формальдегід	1	0

### Висновки

У роботі вперше створено кондуктометричний біосенсор на основі триферментної системи (глюкозооксидаза — інвертаза — мутаротаза) для інгібіторного визначення деяких іонів важких металів. В основі методу лежить ефект інгібування каскаду ферментативних реакцій окиснення сахарози до глюконової кислоти, що супроводжується зміною провідності середовища. Біосенсор виявився найбільш чутливим і селективним до  $\text{Ag}^+$  та  $\text{Hg}^{2+}$  і може бути використаний для аналізу цих сполук з межею визначення 200–300 нМ, це приблизно у 20–50 разів нижче у порівнянні з аналогами. Проведено оптимізацію складу біоселективної мембрани за вмістом ферментів та умов проведення вимірювань.

Порівнюючи характеристики розробленого кондуктометричного біосенсора на основі триферментної системи з існуючими на даний момент аналогічними розробками, можна зробити висновок, що в нашій роботі ми уникли таких недоліків існуючих сенсорів, як складність процедури вимірів [9], висока вартість [9,10], недостатня чутливість [7,8], селективність до певних іонів важких металів [7] тощо. Крім того, така триферментна система може бути використана у подальшому як елемент мультибіосенсора для селективного визначення різних токсичних речовин у водних розчинах.

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми “Сенсорні системи для

медико-екологічних та промислово-технічних потреб”.

### Література

1. Yatsenko V. Determining the characteristics of water pollutants by neural sensors and pattern recognition methods // *Journal of Chromatography A*, — 1996. — 722. — P. 233–243.
2. Мур Дж., Рамамурти С. Тяжелые металлы в природных водах // *М. Мир*. — 1987. — 286 с.
3. Алексеева А.С. Влияние применения нетрадиционных органических удобрений на накопление тяжелых металлов и биологическую активность дерново-подзолистых супесчаных почв: Дис. кан. биол. наук, 06.01.04. — М., 2002. — 14с.
4. Никаноров А.М., Жулидов А.В. Биомониторинг металлов в пресноводных экосистемах // *СПб. Гидрометеоздат*. — 1991. — 312 с.
5. Dzantiev B.B., Yazynina E.V., Zherdev A.V., Plekhanova Yu.V., Reshetilov A.N., Chang S.C., McNeil C.J. Determination of the herbicide chlorsulfuron by amperometric sensor based on separation-free bienzyme immunoassay // *Sensors and Actuators* — 2004. — 98. — P. 254–261.
6. Sherma J., Zweig G. Pesticides // *Anal. Chem.* — 1983. — V. 55. — P. 5.
7. Zhylyak G.A., Dzyadevich S.V., Korpan Y.I., Soldatkin A.P., El'skaya A.V., Application of urease conductometric biosensors for heavy-metal ion determination // *Sensors and Actuators B* — 1995. — 24–25 — P. 145–148.
8. Grabchev I., Guittonneau S. Sensors for detecting metal ions and protons based on new green fluorescent poly(amidoamine) dendrimers peripherally modified with 1,8-naphthalimides // *Journal of*

- Photochemistry and Photobiology A: Chemistry — 2006. — 179. — P. 28–34.
9. Bertocchi P., Ciranni E., Compagnone D., Magearu V., Palleschi G., Pirvutoiu S., Valvo L., Flow injection analysis of mercury(II) in pharmaceuticals based on enzyme inhibition and biosensor detection // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* — 1999. — 20. — P.263–269.
10. Mohammadi H., Amine A., Cosnier S., Mousty C., Mercury—enzyme inhibition assays with an amperometric sucrose biosensor based on a trienzymatic-clay matrix // *Analytica Chimica Acta* — 2005. — 543. — P.143–149.
11. Дзядевич С.В. Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування // *Біополімери і клітина*. — 2005. — Т.21. — №2 — С. 91-106.
12. Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів. — К.: Наук. Думка, — 2006. — С. 67-80.
13. Дзядевич С.В., Солдаткін О.П., Архипова В.М., Шультга О.А., Єльська Г.В. Кондуктометричний ферментний глюкосенсор. Пошук шляхів поліпшення аналітичних характеристик // *Укр. біохім. журнал*. — 1995. — 67, № 6. — С.53-59.