

---

# БІОСЕНСОРИ

---

# BIOSENSORS

---

---

УДК 543.555+577.15+582.923.5:581.143.6+547.94

DOI: 10.18524/1815–7459.2021.4.248177

## АДАПТАЦІЯ ПРОЦЕДУРИ КОІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТІВ З РІЗНИМИ МОДИФІКАЦІЯМИ ЦЕОЛІТІВ НА ПОВЕРХНЮ КОНДУКТОМЕТРИЧНИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ

*О. О. Солдаткін<sup>1</sup>, В. М. Архипова<sup>1</sup>, І. С. Кучеренко<sup>1</sup>, Д. Ю. Кучеренко<sup>1</sup>, С. В. Дзядевич<sup>1,2</sup>*

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

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

e-mail авторів: alex\_sold@yahoo.com, avalka@yahoo.com, kucherenko.i.s@gmail.com,  
didukh.d@gmail.com, dzyad@yahoo.com

## АДАПТАЦІЯ ПРОЦЕДУРИ КОІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТІВ З РІЗНИМИ МОДИФІКАЦІЯМИ ЦЕОЛІТІВ НА ПОВЕРХНЮ КОНДУКТОМЕТРИЧНИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ

*О. О. Солдаткін, В. М. Архипова, І. С. Кучеренко, Д. Ю. Кучеренко, С. В. Дзядевич*

**Анотація.** Проведено порівняльне дослідження різних параметрів кондуктометричних біосенсорів на основі уреази та глюкозооксидази, коімобілізованих з різними типами цеолітів. Продемонстровано, що уреаза, іммобілізована на силікаліті-2, мала кращі показники, ніж іммобілізована уреаза без цеоліту. Кондуктометричний біосенсор з глюкозооксидазою, коімобілізованою з цеолітом NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Beta 25, мав подібні значення відгуків у порівнянні з іммобілізованим ферментом без цеоліту. Ко-іммобілізація цеолітів NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-BEA 30 і H<sup>+</sup>-BEA 30 разом з уреазою призводить до підвищення відгуку біосенсора, при цьому відтворюваність сигналу залишається незмінною. Біосенсори з цеолітами з більшим співвідношенням Si/Al характеризувались підвищеними сигналами. Використання цеолітів, модифікованих метилвіологеном і сріблом, не дало позитивного ефекту.

**Ключові слова:** уреаза, глюкозооксидаза, кондуктометричний біосенсор, цеоліти, коімобілізація ферментів

## ADAPTATION OF THE PROCEDURE OF CO-IMMOBILIZATION OF ENZYMES WITH DIFFERENT MODIFICATIONS OF ZEOLITES ON THE SURFACE OF CONDUCTOMETRIC TRANSDUCERS

*O. O. Soldatkin, V. M. Arkhypova, I. S. Kucherenko, D. Y. Kucherenko, S. V. Dzyadevych*

**Abstract.** A comparative study of different parameters of conductometric biosensors based on urease and glucose oxidase, co-immobilized with different types of zeolites. Urease immobilized on silicalite-2 was shown to have better performance than immobilized urease without zeolites. Conductometric biosensor with glucose oxidase co-immobilized with zeolite  $\text{NH}_4^+$ -Beta 25 had similar response values compared to immobilized enzyme without zeolite. Immobilization of zeolites  $\text{NH}_4^+$ -BEA 30 and  $\text{H}^+$ -BEA 30 together with urease leads to an increase in the response of the biosensor, while the reproducibility of the signal remains unchanged. Biosensors with zeolites with a higher Si/Al ratio were characterized by increased signals. The use of zeolites modified with methylviologen and silver did not give a positive effect.

**Keywords:** urease, glucose oxidase, conductometric biosensor, zeolites, co-immobilization of enzymes

## АДАПТАЦІЯ ПРОЦЕДУРИ КОІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТІВ С РІЗНИМИ МОДИФІКАЦІЯМИ ЦЕОЛІТІВ НА ПОВЕРХНЬ КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИХ ПРЕОБРАЗОВАТЕЛЕЙ

*A. A. Soldatkin, V. N. Arkhipova, I. S. Kucherenko, D. Y. Kucherenko, S. V. Dzyadevych*

**Аннотация.** Проведено сравнительное исследование различных параметров кондуктометрических биосенсоров на основе уреазы и глюкозооксидазы, коиммобилизованных с разными типами цеолитов. Продемонстрировано, что уреазы, иммобилизованная на силикалите-2, имела лучшие показатели, чем иммобилизованная уреазы без цеолита. Кондуктометрический биосенсор с глюкозооксидазой, коиммобилизованной с цеолитом  $\text{NH}_4^+$ -Beta 25, имел схожие значения откликов по сравнению с иммобилизованным ферментом без цеолита. Иммобилизация цеолитов  $\text{NH}_4^+$ -BEA 30 и  $\text{H}^+$ -BEA 30 вместе с уреазой приводит к повышению отклика биосенсора, при этом воспроизводимость сигнала остается неизменной. Биосенсоры с цеолитами с большим соотношением Si/Al характеризовались увеличенными сигналами. Использование цеолитов, модифицированных метилвиологеном и серебром, не дало положительного эффекта.

**Ключевые слова:** уреазы, глюкозооксидаза, кондуктометрический биосенсор, цеолиты, коиммобилизация ферментов

### 1. ВСТУП

Електрохімічні біосенсори розглядаються сьогодні як успішна альтернатива класичним методам аналізу з огляду на існуючі успіхи в розробці їх лабораторних прототипів і вихід на ринок ряду конкурентоспроможних вимірювальних приладів. Біосенсорні прилади мають такі переваги у порівнянні з існуючими методами аналітичної хімії, як простота і зручність у використанні, короткий час аналізу,

портативність, та, головне, низька собівартість та можливість проведення аналізу широким колом осіб як у централізованих лабораторіях, так і в домашніх чи польових умовах [1].

Аналізуючи характеристики наноматеріалів, стає очевидним також, що використання наноматеріалів у біосенсорних технологіях відкриває широкі можливості для застосування різних принципів детектування одного і того ж аналізу та створення мультисенсорних приладів (приладів для одночасного визначення

ряду аналітів, присутніх у зразку). Відповідно це призведе до суттєвої оптимізації часу, зменшення економічних затрат і людських зусиль, необхідних на проведення аналізу з високим ступенем точності та достовірності. Враховуючи той факт, що велика кількість наноматеріалів є біосумісними, їх можна застосовувати для надання певних важливих властивостей тим біоселективним елементам сенсорів, що вже застосовуються, і тим самим розширюючи можливості аналізу. Такі характеристики наноматеріалів, як велика питома поверхня, пористість, температурна стабільність, можливість простої модифікації поверхні різними функціональними групами, хімічна та біологічна стійкість, і в ряді випадків, невисока вартість, також обумовлюють зростання інтересу до застосування даних матеріалів у біосенсоріці.

Успіх іммобілізації ферментів сильно залежить від властивостей використовуваних носіїв. Матеріал-носіє повинен мати високу здатність зв'язувати фермент, бути механічно стабільним і не повинен знижувати ферментативну активність. Органічні носії, такі як полімери, призводять до низки проблем, таких як погана стабільність та проблеми їхньої утилізації [2]. На противагу цьому, неорганічні матеріали, такі як кремнезем і глинозем, є термічно та механічно стабільними та міцними [3, 4].

Цеоліти є перспективними наноматеріалами для модифікації біосенсорів [5]. Вони являють собою неорганічні сполуки, структура яких має кристалічну решітку, що складається з алюмінію і кремнію, зв'язаних атомами кисню. У середині решітки знаходяться поодинокі атоми металів або йони водню, що нейтралізують негативний заряд окремих частин кристала, і сорбована вода. Алюмінієво-кремнієвий скелет утворює багато пір і каналів, що значно збільшує поверхню цеоліту [6]. Вчені виявляють великий інтерес до цеолітів через специфічні властивості останніх. Вони малотоксичні, хімічно, механічно та термостабільні, толерантні до мікроорганізмів [7]. Деякі параметри цеоліту можна контролювати в процесі їх штучного синтезу. Співвідношення Si/Al можна змінювати, таким чином змі-

нюючи заряд цеоліту і гідропатію, кількість і розмір пір. Атоми лужних і лужноземельних металів можуть бути включені в кристалічну решітку і утримуватися там за допомогою координаційних зв'язків [8]. Термічна обробка може регулювати кількість поверхневих –ОН груп, які важливі для іммобілізації цеоліту в біоселективному елементі [9]. Поверхня цеоліту також може бути модифікована різними органічними та неорганічними групами (–NH<sub>2</sub>, –SH, –Cl, –CN, –C<sub>6</sub>H<sub>5</sub> тощо), забезпечуючи таким чином різні взаємодії між цеолітом, ферментом та перетворювачем [10, 11]. Широкий спектр модифікацій дозволяє отримувати цеоліти з різноманітними властивостями, потенційно корисними для розробки біосенсорів.

Кондуктометричні біосенсори засновані на тому, що майже всі ферментативні реакції передбачають або споживання, або утворення заряджених речовин, і, отже, призводять до глобальної зміни іонного складу досліджуваного зразка [12]. Біосенсори, засновані на кондуктометричному принципі, мають ряд переваг: а) тонкоплівкові електроди придатні для мініатюризації та великомасштабного виробництва з використанням недорогих технологій мікроелектроніки, б) вони не потребують жодного електрода порівняння, в) перетворювачі не є світлочутливими, г) керуюча напруга може бути достатньо низькою, щоб істотно зменшити споживання електроенергії, д) великий спектр сполук різної природи можна визначити на основі різних реакцій і механізмів.

Тому було досліджено процедури коіммобілізації ферментів з різними варіантами модифікацій цеолітів на поверхню кондуктометричних перетворювачів.

## 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

### 2.1. Матеріали

Для виготовлення біоселективної мембрани використовували ферменти уреази (КФ 3.5.1.5) із *Canavalia ensiformis* з активністю 15000–50000 од/г та глюкозооксидаза (ГОД) із *Aspergillus niger* (К.Ф. 1.1.3.4) з активністю 100000–250000 од. акт./г препарату виробництва фірми “Sigma-Aldrich”.

Як субстрати використовували сечовину та глюкозу фірми “Sigma-Aldrich”.

Фосфатний буфер був виготовлений з дигідроортофосфат калію ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (чистота 98,5%, Helicon, Росія) та гідроксиду натрію ( $\text{NaOH}$ ) (чистота 99%, Helicon, Росія).

Усі інші реактиви, як вітчизняного, так і імпортного виробництва, були кваліфікації «ос.ч» і «х.ч».

## 2.2. Кондуктометричні датчики і портативний вимірювальний пристрій

В роботі використовувались перетворювачі, виготовлені згідно наших рекомендацій в Інституті фізики напівпровідників імені В. Є. Лашкарьова (м. Київ, Україна). Вони мають розмір 5 мм×30 мм та складаються з двох ідентичних пар тонкошарових планарних золотих електродів, виготовлених за технологією вакуумного напилення золота на непровідну підкладинку з ситалу (рис. 1). Для покращення адгезивних властивостей золота на ситал наносили шар хрому товщиною 50 нм. Кожна така система складається із 20 пар гребінчастих електродів, що мають ширину та зазор між ними 20 мкм із загальною площею чутливої поверхні біля 2 мм<sup>2</sup> [13].

Виміри проводилися за допомогою портативного пристрою «МСП-3», розробленого та виготовленого згідно наших рекомендацій в Інституті електродинаміки НАН України

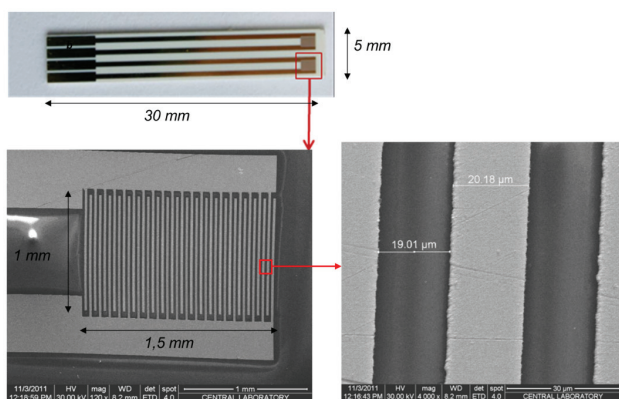


Рис. 1. Зовнішній вигляд кондуктометричних перетворювачів з диференційною парою золотих гребінчастих електродів, нанесених на ситалову підкладинку

(рис. 2). Вимірювання проводили при частоті струму 37 кГц та амплітуді 14 мВ.

## 2.3. Цеоліти та їх характеристики

В роботі використовувались такі цеоліти, як цеоліт Y,  $\text{H}^+$ -Beta 300,  $\text{H}^+$ -Beta 150,  $\text{NH}_4^+$ -Beta 25 – комерційні зразки, отримані від компанії Sud-Chemie (США) та силікаліти, бета-цеоліти з різним співвідношенням Si/Al і цеоліт А, які були синтезовані в Середньосхідному технічному університеті (Анкара, Туреччина).

Мікрофотографії низки цеолітів, отримані за допомогою скануючого електронного мікроскопу, наведено на рис. 3.

**Силікаліт-1.** Вихідний гель для синтезу містив вихідні речовини у наступних молярних співвідношеннях: ТРАОН: 5 TEOS: 500  $\text{H}_2\text{O}$ . Тетраетилортосилікат (TEOS) виступав джерелом кремнію, тетрапропіламмонію 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.

**Силікаліт-2.** Гель, що використовувався для синтезу силікаліту, містив вихідні речовини у наступних молярних співвідношеннях: 1 ТРАОН: 4 TEOS: 350  $\text{H}_2\text{O}$ . Розчин для синтезу був отриманий шляхом змішування TEOS, ТРАОН та деіонізованої води протягом 6 го-

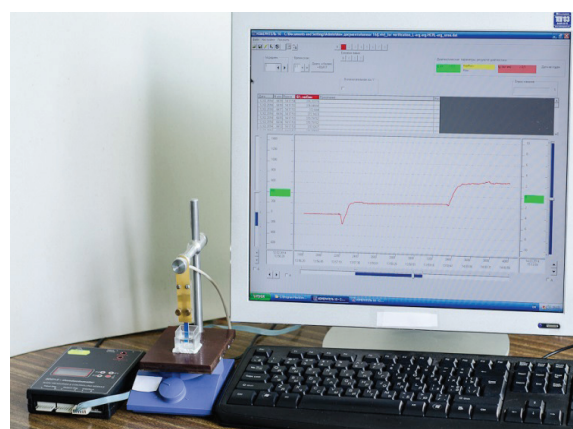
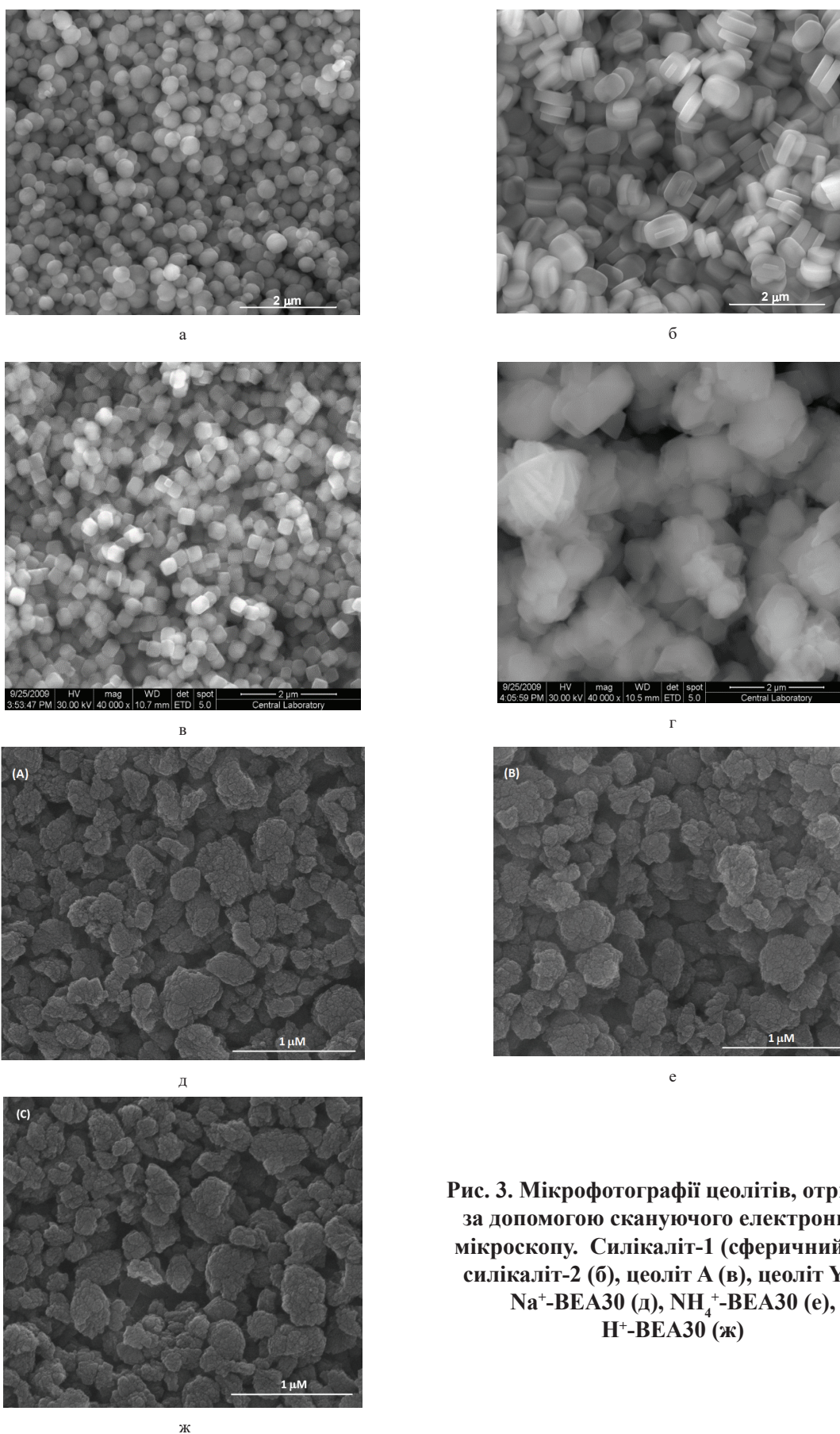


Рис. 2. Загальний вигляд кондуктометричної установки на основі портативного аналізатора «МСП-3»



**Рис. 3. Мікрофотографії цеолітів, отримані за допомогою скануючого електронного мікроскопу. Силікаліт-1 (сферичний) (а), силікаліт-2 (б), цеоліт А (в), цеоліт Y (г), Na<sup>+</sup>-BEA30 (д), NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-BEA30 (е), H<sup>+</sup>-BEA30 (ж)**

дин, після чого його ставили в термостат на 1 добу при 125 °С для кристалізації. Чистий силікаліт отримували після центрифугування з деіонізованою водою при 7500 об./хв та висушували при 50 °С. Потім продукт був кальцинований на повітрі за температури 650 °С протягом 6 годин.

**Бета-цеоліти з різним співвідношенням Si/Al.** Зразки цеоліту Na<sup>+</sup>-BEA були гідротермально синтезовані з розчинів гелю, що мають склад 1,92Na<sub>2</sub>O: Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: ySiO<sub>2</sub>: 4,6(TEA)<sub>2</sub>O: 444H<sub>2</sub>O. Склад визначали за зміною співвідношення SiO<sub>2</sub>/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (y = 30, 40, 50, 60) зразків Na<sup>+</sup>-BEA. Розчин попередника алюмінату натрію для цеоліту BEA готували шляхом розчинення NaOH (>97 мас.%, JT Baker) та алюмінату натрію (50,8 мас.% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 43,4 мас.% Na<sub>2</sub>O, Riedel de Haën) у деіонізованій воді (питомий опір > 18 МОм см<sup>-1</sup>). Потім додавали розчин гідроксиду тетраетиламонію (TEAOH 35 мас.%, у воді, Aldrich), який є структуро-направляючим агентом для синтезу цеоліту BEA, та ретельно перемішували приготований розчин попередника. Розчин колоїдного кремнезему Ludox® HS-40 (суспензія 40 мас.% SiO<sub>2</sub> у воді, Sigma Aldrich) додавали до алюмінатного попередника та ретельно перемішували перед тим, як помістити в автоклави із нержавіючої сталі, покриті тефлоном. Автоклави зберігали статично при 120 °С у звичайній печі протягом 7 днів. Отримані тверді частинки фільтрували під вакуумом, промивали деіонізованою водою і сушили при кімнатній температурі. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> форми кристалів BEA отримували шляхом іонного обміну з 1 М водним нітратом амонію при 80 °С протягом 24 год. Кислотні (H<sup>+</sup>) форми отримували прожарюванням кристалів NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-BEA 30 при 500 °С протягом 6 год.

Зразки модифікували метилвіологеном (MV) шляхом перемішування 100 мг MV і 300 мг порошку цеоліту в 20 мл дистильованої води протягом 24 годин при кімнатній температурі. Потім отриманий розчин двічі центрифугували при 10000 об./хв протягом 10 хвилин. Отримані частинки сушили протягом ночі при 60 °С.

Іонообмінну процедуру застосовували шляхом перемішування 300 мг цеолітів з роз-

чином 120 мг AgNO<sub>3</sub> і 100 мл дистильованої води протягом 24 годин у темному середовищі. Модифікацію частинок BEA цеоліту в наночастинки срібла здійснювали шляхом відновлення іонообмінних зразків срібла в суспензії боргідриду натрію (60 мМ) при кімнатній температурі. Після кожного етапу отриманий розчин двічі центрифугували при 10000 об./хв протягом 10 хвилин, а потім частинки цеоліту сушили протягом ночі в печі при 60 °С.

#### 2.4. Методика іммобілізації ферментів на поверхню перетворювачів

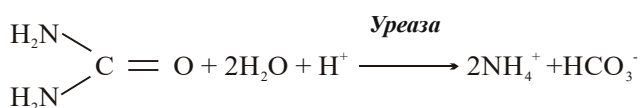
Для створення біоматриць за основу був взятий метод іммобілізації ферментів за допомогою глутарового альдегіду. Біоселективні мембрани отримували шляхом коіммобілізації ензиму у суміші з БСА у парах ГА на поверхні перетворювача. Для виготовлення робочої мембрани готували розчини ферментів та БСА у 20 мМ фосфатному буферному розчині (рН 7,4) з кінцевими концентраціями 10 мг/мл – 100 мг/мл в залежності від задач експерименту, та змішували їх у співвідношенні 1:1. До суміші ензим-БСА додавали гліцерин до кінцевої концентрації 10% для стабілізації ензиму при іммобілізації та запобігання передчасному висиханню розчину, нанесеного на поверхню перетворювачів. Суміш для приготування референтної мембрани готували таким же чином, але замість ензиму брали тільки розчин БСА в подвійній концентрації. Краплю суміші фермент-БСА (ферментна мембрана) наносили на одну частину поверхні перетворювача, на іншу – розчин БСА без ферменту (референтна мембрана). Для полімеризації мембран датчики розміщували в атмосферу насичених парів глутарового альдегіду в ексикаторі на 20–30 хв. Після полімеризації біосенсори витримували протягом 15–20 хвилин на повітрі за кімнатної температури та відмивали в робочому буферному розчині (10–15 хв.) від незв'язаних компонентів біоселективних мембран та надлишку глутарового альдегіду.

Для виготовлення модифікованих наночастинками мембран змішували вихідні розчини ферментів та розчин (суспензію) цеолітів в об'ємному співвідношенні компонентів 1:1.

Відразу після цього результуючу суміш загальним об'ємом 0,2 мкл наносили на чутливу поверхню пари електродів та розподіляли рівномірним шаром до повного її покриття. Для полімеризації мембран датчики розміщували в атмосфері насичених парів глутарового альдегіду в ексикаторі на 20–30 хв. Після полімеризації біосенсори витримували протягом 15–20 хвилин на повітрі за кімнатної температури та відмивали в робочому буферному розчині (10–15 хв.) від незв'язаних компонентів біоселективних мембран та надлишку глутарового альдегіду.

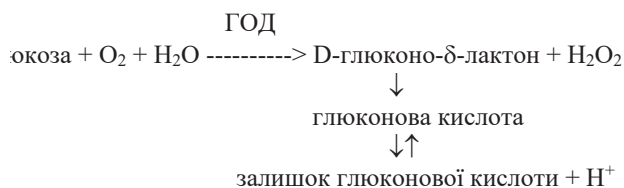
### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У разі аналізу сечовини результуючі зміни провідності викликаються ферментативно каталізованим гідролізом субстрату:



а для глюкози вони зумовлені дисоціацією глюконової кислоти, що утворюється в резуль-

таті ферментативного окислення глюкози за схемою:



Типова залежність відгуку кондуктометричного біосенсора від часу після додавання глюкози показана на рис. 4. Після досягнення біосенсором стабільної базової лінії в фоновому фосфатному буферному розчині додавання глюкози викликало відгук біосенсора, який була результатом локального збільшення концентрації протонів всередині мембрани. Як видно, час відгуку біосенсора у стаціонарному режимі, тобто час, необхідний для досягнення 90% амплітуди стабільного стану, становив приблизно 1–2 хв.

Спочатку досліджували вплив завантаження цеоліту в іммобілізаційну суміш на відгук біосенсора на 0,2 мМ глюкози. Різні концентрації силікаліту-2 в мембрані були випробувані для оптимізації величини завантаження цеоліту відповідно до відгуку сенсора

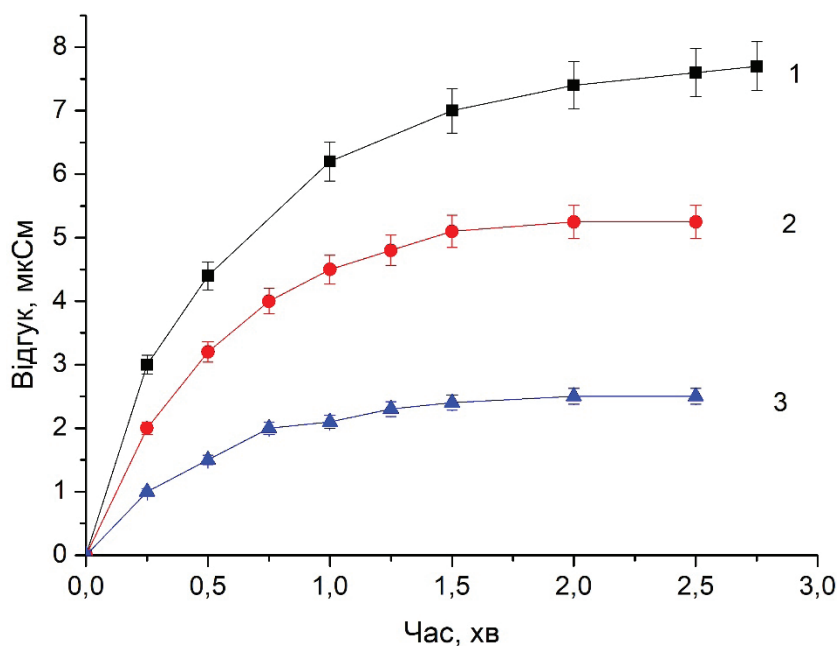


Рис. 4. Типові криві відгуків кондуктометричного біосенсора на основі глюкозооксидази з використанням силікаліту-1 для 1 мМ (1), 0,6 мМ (2) та 0,3 мМ (3) глюкози. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4

(рис. 5). Відгуки біосенсора з 5% цеолітом були низькими у порівнянні з відгуками з меншою концентрацією цеоліту в мембрані. Рівень насичення відгуків біосенсорів також різниться залежно від концентрації цеолітів у мембранах. Для подальшої експериментальної роботи використовували біосенсори з використанням 0,5% цеоліту.

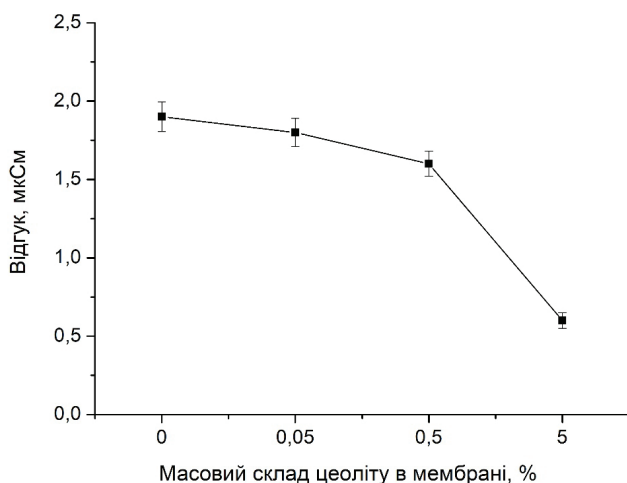
Щоб визначити вплив часу поперечного зшивання для ферменту, електроди витримували в парах глутарового альдегіду протягом різного часу. Як показано на рис. 6 для цеоліту А, спостерігали, що час витримки в парах глутарового альдегіду протягом 25 хвилин привів до найвищого відгуку біосенсора для визначення сечовини і, таким чином, до оптимального часу для поперечного зшивання уреазі. Насправді, якщо час витримки залишається коротким для іммобілізації, може статися вимивання ферменту через мембрану через недостатній рівень з'єднання. Це призведе до поганої стабільності біосенсорів, і відповідно спостерігається зниження відгуків сенсорів. З іншого боку, якщо час експозиції для іммобілізації довший за оптимальне значення, також спостерігається зниження відгуків. Це може бути пов'язано з утворенням великої кількості

зв'язків між глутаровим альдегідом і молекулами ферменту, що призводить до ущільнення мембрани. Таким чином, активний центр ферменту може бути недоступним для молекул субстратів.

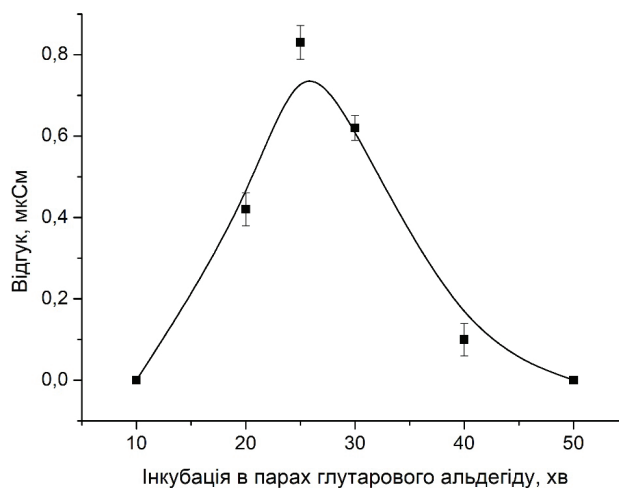
Добре відомо, що вибір буфера може впливати на активність ферменту. Найбільш часто використовуваним буфером у подібних системах є фосфатний буферний розчин. Було отримано, що найвище значення відгуків датчика спостерігалося при використанні розчину з рН 7,4 для уреазі, коіммобілізованої з цеолітом А, тобто оптимум рН для такої системи був 7,4.

Як видно з рис. 7, уреазі іммобілізована з силікалітом-2 показала найвищий відгук у порівнянні з іншими цеолітами, а також вищий, ніж уреазі, іммобілізована без цеоліту. Силікаліт-2 не має алюмінію, тому є найбільш гідрофобним матеріалом серед усіх досліджуваних зразків. Крім того, цеоліт Y показав дещо вищу реакцію, ніж цеоліт А. Це може бути пов'язано з відносно більшим розміром пор і співвідношенням Si/Al і площею поверхні цеоліту Y щодо кристалів цеоліту А.

Дуже цікавим матеріалом є бета-цеоліт (BEA) – цеоліт з великими порами з триви-



**Рис. 5.** Залежність відгуків глюкозного біосенсора від масового відсотка цеоліту (силікаліт 2) в мембранах. Склад мембрани: 5% GOD, 5% BSA, 20 mM PBS, pH 7,4, 10% гліцерин



**Рис. 6.** Залежність відгуків кондуктометричних біосенсорів від часу зшивання в парах глутарового альдегіду для уреазі та цеоліту А в мембранах біосенсору



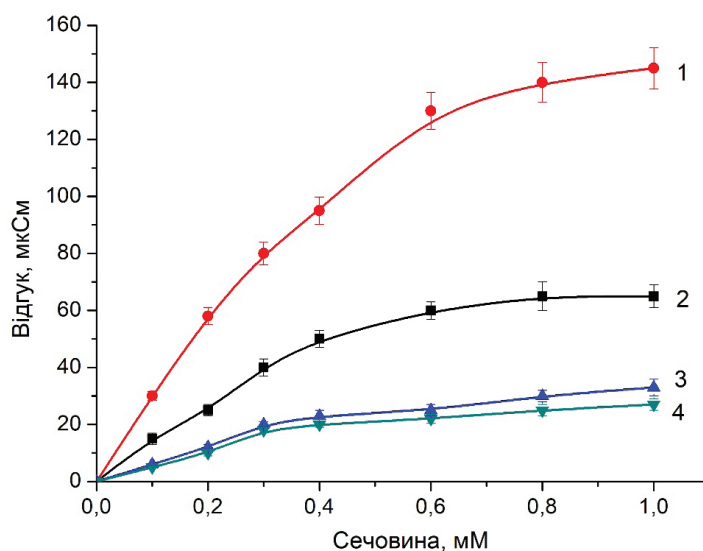
мірною системою взаємопов'язаних каналів з 12-членними отворами (7,6 x 6,4 Å) [14]. З моменту свого відкриття в 1967 році цей тип цеоліту представляв великий інтерес через можливість його синтезу з широким діапазоном співвідношення Si/Al від 5 до нескінченності. Він привернув велику увагу як потенційний каталізатор у численних реакціях через його кислотні властивості. Найбільш цікавим для каталітичних цілей є те, що ВЕА-цеоліт може бути легко модифікований різними йонними частинками, що може призвести до утворення різних кислотних і гідрофобних областей на його зовнішній поверхні. Це повинно дозволити досліджувати зміну гідрофобної та кислотної природи цього матеріалу на характеристики біосенсорів.

Тому було перевірено потенціал різноманітних модифікацій ВЕА-цеолітів для контрольованого покращення аналітичних характеристик кондуктометричних біосенсорів для визначення сечовини. Відповідно досліджено вплив амонійного ( $\text{NH}_4^+$ ) та протонного ( $\text{H}^+$ ) іонного обміну, різного співвідношення Si/Al, та модифікації тих самих цеолітів метилвіологеном на отримані характеристики біосенсорів.

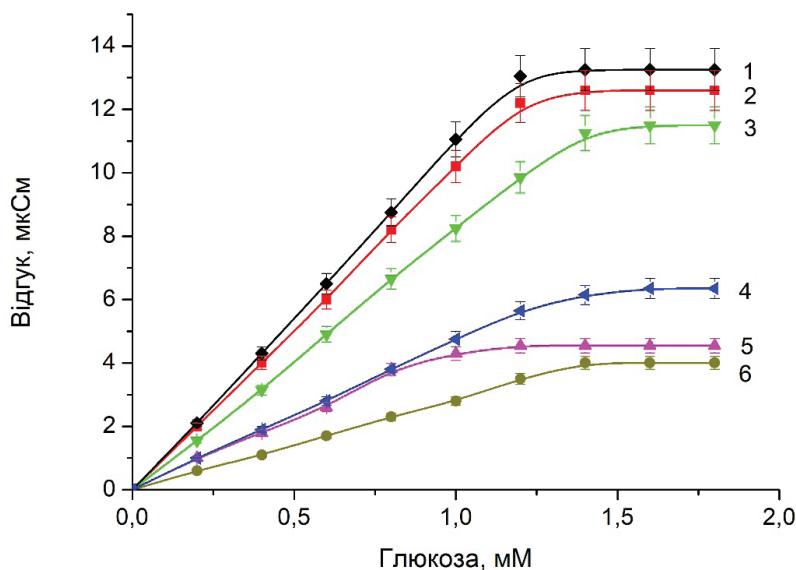
Калібрувальні криві лабораторних прототипів кондуктометричних біосенсорів на осно-

ві глюкозооксидази без цеоліту та іммобілізованої з різними цеолітами наведені на рис. 8. Лінійний динамічний діапазон визначення глюкози становив до 1–1,5 мМ у 5 мМ фосфатному буферному розчині з межею виявлення 200 нМ. Аналіз робочих характеристик розроблених біосенсорів продемонстрував лінійний діапазон визначення глюкози для ферменту, іммобілізованого з цеолітами, майже в тому ж діапазоні концентрацій, що й глюкозооксидаза, іммобілізована без цеоліту. Біосенсор з ГОД, коіммобілізованою з  $\text{NH}_4^+$ -Beta 25, демонстрував найкращі робочі характеристики: низька межа виявлення, високий рівень відгуку, високу операційну стабільність та стабільність при зберіганні.

Було досліджено вплив цеоліту  $\text{Na}^+$ -ВЕА 30, доданого до біоселективного елемента, на відгук біосенсора та лінійний діапазон вимірювання. З калібрувальної кривої для біосенсора з 5% цеолітом і такою ж без цеоліту (рис. 9) видно, що наявність цеоліту  $\text{Na}^+$ -ВЕА 30 не має помітного ефекту. Типовим методом активації бета-цеоліту для каталітичних цілей є зміна його кислотного характеру за рахунок, насамперед, іонного обміну амонію, що призводить до зміни іонів  $\text{Na}^+$  з іонами  $\text{NH}_4^+$  в каркасі цеоліту ( $\text{NH}_4^+$ -ВЕА). Наступним кроком



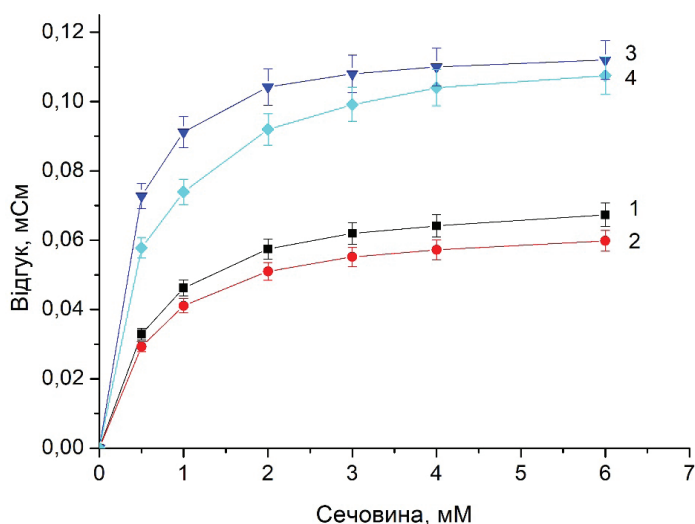
**Рис. 7.** Калібрувальні криві для визначення сечовини для біосенсора на основі уреазі, коіммобілізованої в мембрані з силікалітом-2 (1), без цеоліту (2), цеоліту Y (3) та цеоліту A (4). Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4



**Рис. 8.** Калібрувальні криві для визначення глюкози для кондуктометричного біосенсора на основі глюкозооксидази, коїмобілізованої з  $\text{NH}_4^+$ -Beta 25 (2), Силікаліт-1 (3), Силікаліт-2 (4),  $\text{H}^+$ -Beta 300 (5),  $\text{H}^+$ -Beta 150 (6) і без цеоліту (1). Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4

є застосування процедури термічної обробки для перетворення цих іонів  $\text{NH}_4^+$  в іони  $\text{H}^+$  ( $\text{H}^+$ -BEA). Іонообмін амонію є кращим, оскільки він зменшує можливість пошкодження структури цеоліту BEA під час термічної обробки. Відповідно до цього дослідження, цеоліт  $\text{Na}^+$ -BEA 30 також був модифікований шляхом спо-

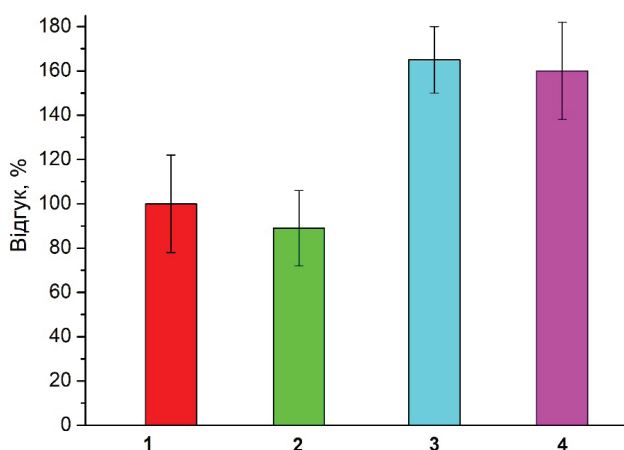
чатку перетворення  $\text{Na}^+$ -BEA 30 в  $\text{NH}_4^+$ -BEA 30 шляхом обміну іонів натрію на іони амонію. Після цього  $\text{NH}_4^+$ -BEA 30 перетворювали в  $\text{H}^+$ -BEA 30 шляхом прожарювання. Отримані калібрувальні криві як функцію цього перетворення для біосенсорів з модифікованими цеолітами можна побачити на рис. 9.



**Рис. 9.** Вплив цеолітів на калібрувальні криві біосенсорів для визначення сечовини. Уреазу коїмобілізували з цеолітами  $\text{Na}^+$ -BEA 30 (2),  $\text{NH}_4^+$ -BEA 30 (3) і  $\text{H}^+$ -BEA 30 (4). Для порівняння використовується іммобілізація уреазы без цеолітів (1). Концентрація цеоліту в біоселективному елементі біосенсора – 5%. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4

Як показано на рис. 9, наявність модифікованих цеолітів у мембрані суттєво вплинула на величину сигналу  $i$ , отже, на чутливість біосенсора, тоді як лінійний діапазон вимірювань змінювався незначно. Ось чому, щоб продемонструвати ефект цеоліту більш очевидно, відгуки біосенсорів на 6 мМ сечовини (що є кінцевою концентрацією насичення) представлені у вигляді діаграми на рис. 10 як залежність від типу модифікованих цеолітів. Відгук біосенсора тільки на основі уреазу без будь-якого цеоліту, був прийнятий за 100%. Результати показали, що найбільш чутливими були біосенсори з цеолітами  $\text{NH}_4^+$ -ВЕА 30 та  $\text{H}^+$ -ВЕА 30.

Показано, що цеоліти  $\text{NH}_4^+$ -ВЕА 30 та  $\text{H}^+$ -ВЕА 30 у складі біоселективних елементів підвищують чутливість біосенсора до субстрату. Одним із визнаних методів зміни кислотних властивостей цеолітів є зміна іонів  $\text{Na}^+$  в рамках цеолітів. Оскільки під час іонного обміну відношення  $\text{Si}/\text{Al}$  підтримувалося постійним на рівні  $10 \pm 1$ , таке збільшення чутливості біосенсорів може бути пов'язане зі збільшенням кислотних властивостей, пов'язаних зі зміною поверхневих груп цеоліту ВЕА. Відомо, що амонієвий обмін цеоліту ВЕА посилює його кислотний характер, що призводить до значно-

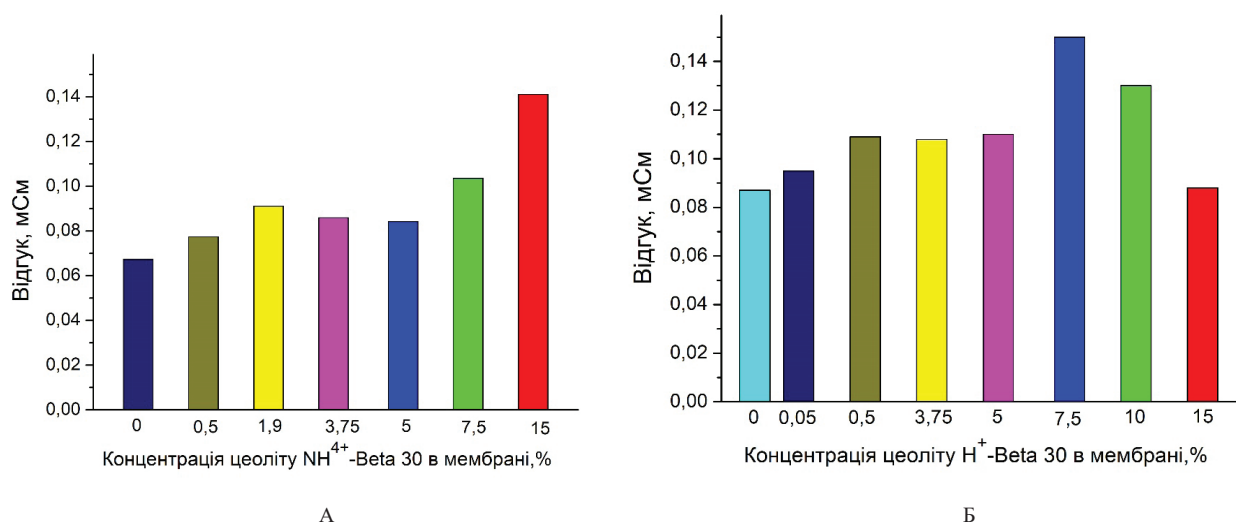


**Рис. 10.** Відгуки біосенсорів на 6 мМ сечовину без цеолітів  $\text{Na}^+$ -ВЕА 30 (2),  $\text{NH}_4^+$ -ВЕА 30 (3),  $\text{H}^+$ -ВЕА 30 (4). Концентрація цеоліту в мембрані – 5%. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4

го збільшення концентрації кислотних центрів Бренстеда і, таким чином, концентрації іонів  $\text{H}^+$ , пов'язаних з тетраедрично координованими групами  $\text{Al-OH-Si}$  в каркасі цеоліту [14]. Також було показано, що відносно підвищення кислотності з подальшим перетворенням  $\text{NH}_4^+$ -ВЕА в  $\text{H}^+$ -ВЕА може бути практично постійним. Цей факт відповідає характеру реакції каталізу сечовини, яка була прикладом системи гідролізу, яка потребує протону як реагенту. Таким чином було показано, що підвищення кислотності цеоліту ВЕА стимулює уреазну реакцію в результаті збільшення протонних донорних ділянок цеолітної мережі. Однак важливо також перевірити, чи мають цеоліти якийсь негативний вплив на відтворюваність сигналу. Для цього вимірювали реакції біосенсорів на 6 мМ уреазу протягом робочого дня з 20-хвилинними інтервалами, які витримували в робочому буфері при кімнатній температурі. Похибки вимірювання ( $S_d$ ) були приблизно однаковими (2%) для біосенсорів як з цеолітами, так і без них.

Ще одним параметром, який необхідно досліджувати, є відтворюваність біосенсорної активності після іммобілізації різними методами, так звана взаємовідтворюваність біосенсорів (inter-assay). Біосенсори з 5% концентрацією цеолітів  $\text{NH}_4^+$ -ВЕА 30 та  $\text{H}^+$ -ВЕА 30 тестувалися разом із контрольними мембранами без цеоліту. Показано, що додавання цеоліту  $\text{NH}_4^+$ -ВЕА 30 з концентрацією 5% призвело до покращення взаємовідтворюваності, однак додавання  $\text{H}^+$ -ВЕА 30 з концентрацією 5% не спричинило жодних змін. Підвищення концентрації  $\text{NH}_4^+$ -ВЕА 30 від 5 до 15% призводило до більшого  $S_d$  а, отже, погіршення взаємовідтворюваності.

На наступному етапі була проведена оптимізація концентрації цеоліту в мембрані. До складу мембрани в різних кількостях додавали цеоліти  $\text{NH}_4^+$ -ВЕА 30 та  $\text{H}^+$ -ВЕА 30. Як видно з рис. 11, оптимальні концентрації цеоліту становили 15% і 7,5% для  $\text{NH}_4^+$ -ВЕА 30 і  $\text{H}^+$ -ВЕА 30 відповідно. Ймовірно, спостережуване зниження реакції на  $\text{H}^+$ -ВЕА 30 при використанні концентрацій вище 7,5% (рис. 11-Б), а також гірша взаємовідтворюваність, що спо-



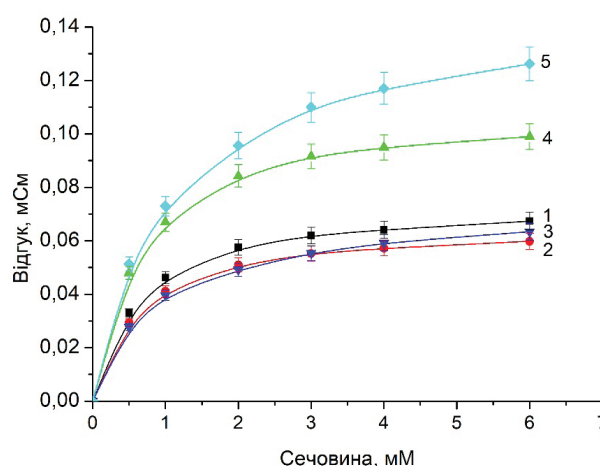
**Рис. 11. Залежність відгуків уреазних біосенсорів від концентрації цеоліту в мембрані (А - NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-BEA 30; В – H<sup>+</sup>-BEA 30). Кінцева концентрація субстрату – 6 мМ. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4**

стерігається при використанні 15% NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-BEA 30, ймовірно, пояснюється до несумісності та поганого змішування ферментно-цеолітної суміші, нанесеної на перетворювач, що призвело до низької якості іммобілізації біоселективного елемента.

Таким чином, можна досягти найвищої чутливості біосенсора (рис. 11-А) або покращити взаємовідтворюваність біосенсора, змінюючи концентрацію цеоліту NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-BEA 30 в біоактивному елементі.

Співвідношення кремнію та алюмінію (Si/Al) є важливою характеристикою цеолітів. Відомо, що цеоліти з більшою кількістю алюмінію мають більші гідрофільні властивості [15]. Очевидно, що гідрофобність цеоліту впливає на взаємодію між молекулами ферменту та кристалами цеоліту. Тому також досліджували вплив співвідношення Si/Al (тобто 30, 40, 50 і 60) цеоліту Na<sup>+</sup>-BEA. Як видно з рис. 12, зменшення співвідношення Si/Al супроводжується зменшенням значень відповіді. Це явище може бути результатом зниження гідрофобних взаємодій між молекулами ферменту та кристалами цеоліту. Відповідно, використання цеолітів з високим співвідношенням Si/Al може бути перспективним підходом для подальшого покращення характеристик біосенсорів.

Крім того, досліджено вплив додавання цеолітів, модифікованих метилвіологеном та іонами срібла. Спочатку цеоліт Na<sup>+</sup>-BEA 40, 50 і 60 модифікували шляхом інтеграції метилвіологена (MV) в їх пори. Очікувалося, що метилвіологен змінить провідність пор; однак збільшення відповідей біосенсорів у порівнянні з біосенсорами, що містять немодифіковані цеоліти, не спостерігалось. Таким чином, ви-



**Рис. 12. Калібрувальні криві біосенсорів на основі уреазі, іммобілізованої без цеолітів (1) та з цеолітами: Na<sup>+</sup>-BEA 30 (2), Na<sup>+</sup>-BEA 40 (3), Na<sup>+</sup>-BEA 50 (4), Na<sup>+</sup>-BEA 60 (5). Концентрація цеоліту в мембрані – 5%. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4**

користання цеолітів, модифікованих метилвіологеном, у кондуктометричних біосенсорах не має сенсу. Крім того, щоб змінити іонні властивості цеоліту  $\text{Na}^+$ -BEA 40, 50 і 60, іони срібла були обмінені іонами натрію ( $\text{Na}^+$ ), які вже присутні в синтезованих цеолітах. Було отримано, що іонний обмін срібла і наночастинки срібла, включаючи цеоліти, не дають жодної реакції до введення 5 мМ сечовини. Причиною може бути інгібування уреазу за рахунок іонів срібла, які повільно вивільняються з цеоліту.

#### 4. ВИСНОВКИ

Проведено порівняльне дослідження різних параметрів кондуктометричних біосенсорів на основі уреазу та глюкозооксидази, коімобілізованих з різними типами цеолітів. Зокрема, продемонстровано, що уреазу, іммобілізована на силікаліті-2, мала кращі показники, ніж іммобілізована уреазу без цеоліту. Кондуктометричний біосенсор з глюкозооксидазою, коімобілізованою з цеолітом  $\text{NH}_4^+$ -Beta 25, мав подібні значення відгуків у порівнянні з іммобілізованим ферментом без цеоліту. Іммобілізація цеолітів  $\text{NH}_4^+$ -BEA 30 і  $\text{H}^+$ -BEA 30 разом з уреазою призводить до підвищення відгуку біосенсора, при цьому відтворюваність сигналу залишається незмінною. Біосенсори з цеолітами з більшим співвідношенням Si/Al характеризувались підвищеними сигналами. Використання цеолітів, модифікованих метилвіологеном і сріблом, не дало позитивного ефекту.

Ці результати свідчать про те, що цеоліти різних типів можуть бути використані як альтернатива для іммобілізації ферментів при розробці кондуктометричних біосенсорів. Показано, що різні цеоліти з різними характеристиками призводять до різних результатів для біосенсорів. Таким чином, можна припустити, що різні властивості цеолітів, такі як їх іонообмінна поведінка, розміри частинок, групи поверхні, розміри пор і співвідношення Si/Al, можуть бути адаптовані таким чином, щоб можна було досягти оптимальної продуктивності біосенсора при виборі правильного типу цеоліту та налаштування його характеристик властивостей.

#### 5. ПОДЯКА

Робота була проведена завдяки фінансовій підтримці від Національного фонду досліджень України в рамках конкурсу проєктів із виконання наукових досліджень і розробок “Підтримка досліджень провідних та молодих учених” (проєкт 2020.02/0097) та НАН України в рамках цільової програми наукових досліджень НАН України ««Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій».

#### Список використаної літератури

- [1]. Dzyadevych S. V. Naukovi ta tekhnolohichni zasady stvorennia miniatiurnykh elektrokhimichnykh biosensoriv / S. V. Dzyadevych, O. P. Soldatkin. – K: Naukova dumka NANU, 2006. – 255 s. (in Ukrainian).
- [2]. Norouzian D., Enzyme immobilization: the state of art in biotechnology // Iranian Journal of Biotech. – 2003. – V.1, N4. – P. 197–206.
- [3]. Karakuş E., Pekyardımcı Ş., Immobilization of apricot pectinesterase (*Prunus armeniaca* L.) on porous glass beads and its characterization // Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. – 2009. – V.56. – P. 13–19.
- [4]. Johnson M., Li Z., Wang J., Yan Y., Mechanical characterization of zeolite low dielectric constant thin films by nanoindentation // Thin Solid Films. – 2007. – V.515, N6. – P. 3164–3170.
- [5]. Granda Valdes M., Perez-Cordoves A. I., Diaz-Garcia M. E. Zeolites and zeolite-based materials in analytical chemistry // Trends in Analytical Chemistry. – 2006. – 25. – P. 24–30.
- [6]. Meier W. M., Olsen D. H. Atlas of Zeolite Structure Types / New York: Wiley-Interscience. – 1974.
- [7]. Adalgisa Tavolaro, Palmira Tavolaro, Enrico Drioli. Zeolite inorganic supports for BSA immobilization: Comparative study of several zeolite crystals and composite membranes // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2007. – 55. – P. 67–76.
- [8]. Baohong Liu, Fang Yan, Jilie Kong, Jiaqi Deng. A reagentless amperometric biosensor

based on the coimmobilization of horseradish peroxidase and methylene green in a modified zeolite matrix // *Analytica Chimica Acta.* – 1999. – 386. – P. 31–39.

[9]. Öztürk S., Akata B. Oriented assembly and nanofabrication of zeolite A monolayers // *Micropor. Mesopor. Mat.* – 2009. – 126. – P. 228–233.

[10]. Liu A. M., Hidajat K., Kawi S., Zhao D. Y. A new class of hybrid mesoporous materials with functionalized organic monolayers for selective adsorption of heavy metal ions // *Chem. Commun.* – 2000. – 13. – P. 1145–1146.

[11]. Humphrey Hak Ping Yiu, Paul A. Wright, Nigel P. Botting. Enzyme immobilisation using SBA-15 mesoporous molecular sieves with functionalised surfaces // *J. Mol. Catal. B: Enzymatic.* – 2001. – 15. – P. 81–92.

[12]. Dzyadevych S. V., Jaffrezic-Renault N., Conductometric Microbiosensors

for Environmental Monitoring // *Sensors.* – 2008. – V.8. – P. 2569–2588.

[13]. Kukla O. L. Patent Ukrainy na korysnu model «Analoho-tsyfrovyi ionno-sensornyi vymiriuvach parametriv ridkykh seredovyshech» / Kukla O. L., Pavliuchenko O. S., Bushma O. V., Holtvianskyi Yu. V., Dzyadevych S. V., Soldatkin O. P. // UA No. 48359 MPK G01N27/26, 27/27 – zaiavl. 26.10.2009, opubl. 10.03.2010 – Biul. No.5. (*in Ukrainian*).

[14]. Kuehl G. H., Timken H. K. C. Acid sites in zeolite Beta: effects of ammonium exchange and steaming // *Micropor. Mesopor. Mat.* – 2000. – 35–36. – P. 521–532.

[15]. Eng-Poh Ng, Mintova S. Nanoporous materials with enhanced hydrophilicity and high water sorption capacity // *Micropor. Mesopor. Mat.* – 2008. – 114. – P. 1–26.

Стаття надійшла до редакції 24.11.2021 р.

UDC543.555+577.15+582.923.5:581.143.6+547.94

DOI: 10.18524/1815-7459.2021.4.248177

## ADAPTATION OF THE PROCEDURE OF CO-IMMOBILIZATION OF ENZYMES WITH DIFFERENT MODIFICATIONS OF ZEOLITES ON THE SURFACE OF CONDUCTOMETRIC TRANSDUCERS

*O. O. Soldatkin<sup>1</sup>, V. M. Arkhypova<sup>1</sup>, I. S. Kucherenko<sup>1</sup>, D. Y. Kucherenko<sup>1</sup>, S. V. Dzyadevych<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Zabolotnogo Street 150, 03680 Kyiv, Ukraine;

<sup>2</sup>Institute of High Technologies of Taras Shevchenko National University of Kyiv, 4G Glushkova Av., 03022 Kyiv, Ukraine.

e-mail: alex\_sold@yahoo.com, avalka@yahoo.com, kucherenko.i.s@gmail.com, didukh.d@gmail.com, dzyad@yahoo.com

### Summary

Zeolites are promising nanomaterials for modification of biosensors due to such characteristics as large specific surface area, porosity, temperature stability, the possibility of simple surface modification by different functional groups, chemical and biological stability, and in some cases, low cost.

**The aim** of the work was to adapt the procedure of co-immobilization of glucose oxidase and urease enzymes with different modifications of zeolites to the surface of conductometric transducers.

**Research methods:** The conductometric method of analysis with differential measurement mode was used in the work. Conductometric transducers were used as sensors. The enzymes glucose oxidase and urease, which were co-immobilized with different types of zeolites, were used in the production of the bioselective membrane of the biosensor.

**Results:** It was shown that urease immobilized on silicalite-2 had better performance than immobilized urease without zeolite. Conductometric biosensor with glucose oxidase co-immobilized with zeolite  $\text{NH}_4^+$ -Beta 25 had similar response values compared to immobilized enzyme without zeolite. Immobilization of zeolites  $\text{NH}_4^+$ -BEA 30 and  $\text{H}^+$ -BEA 30 together with urease leads to an increase in the response of the biosensor, while the reproducibility of the signal remains unchanged. Biosensors with zeolites with a higher Si / Al ratio were characterized by increased signals.

**Conclusions:** Zeolites of different types can be used as an alternative for immobilization of enzymes in the development of conductometric biosensors. Various properties of zeolites, such as their ion exchange behavior, particle size, surface group, pore size and Si / Al ratio, can be adapted so that better analytical characteristics of biosensors can be achieved.

**Keywords:** urease, glucose oxidase, conductometric biosensor, zeolites, co-immobilization of enzymes

УДК 543.555+577.15+582.923.5:581.143.6+547.94

DOI: 10.18524/1815-7459.2021.4.248177

## АДАПТАЦІЯ ПРОЦЕДУРИ КОІММОБІЛІЗАЦІЇ ФЕРМЕНТІВ З РІЗНИМИ МОДИФІКАЦІЯМИ ЦЕОЛІТІВ НА ПОВЕРХНЮ КОНДУКТОМЕТРИЧНИХ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ

*О. О. Солдаткін<sup>1</sup>, В. М. Архипова<sup>1</sup>, І. С. Кучеренко<sup>1</sup>, Д. Ю. Кучеренко<sup>1</sup>, С. В. Дзядевич<sup>1,2</sup>*

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

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

e-mail авторів: alex\_sold@yahoo.com, avalka@yahoo.com,  
kucherenko.i.s@gmail.com, didukh.d@gmail.com, dzyad@yahoo.com

### Реферат

Цеоліти є перспективними наноматеріалами для модифікації біосенсорів завдяки таким характеристикам, як велика питома поверхня, пористість, температурна стабільність, можливість простої модифікації поверхні різними функціональними групами, хімічна та біологічна стійкість, і в ряді випадків, невисока вартість.

**Мета роботи** полягала в адаптації процедури коімобілізації ферментів глюкозооксидаза та уреаза з різними модифікаціями цеолітів на поверхню кондуктометричних перетворювачів.

**Методи дослідження:** В роботі застосовували кондуктометричний метод аналізу з диференційним режимом вимірювання. Як датчики використовувались кондуктометричні перетворювачі. При виготовленні біоселективної мембрани біосенсора використовували ферменти глюкозооксидаза та уреаза, які були коімобілізовані з різними типами цеолітів.

**Результати дослідження:** Показано, що уреаза, іммобілізована на силікаліті-2, мала кращі показники, ніж іммобілізована уреаза без цеоліту. Кондуктометричний біосенсор з глюкозооксидазою, коімобілізованою з цеолітом  $\text{NH}_4^+$ -Beta 25, мав подібні значення відгуків у порівнянні з іммобілізованим ферментом без цеоліту. Іммобілізація цеолітів  $\text{NH}_4^+$ -BEA 30 і  $\text{H}^+$ -BEA 30 разом з уреазою призводить до підвищення відгуку біосенсора, при цьому відтворюваність сигналу

залишається незмінною. Біосенсори з цеолітами з більшим співвідношенням Si/Al характеризувались підвищеними сигналами.

**Висновки:** Цеоліти різних типів можуть бути використані як альтернатива для іммобілізації ферментів при розробці кондуктометричних біосенсорів. Різні властивості цеолітів, такі як їх іонообмінна поведінка, розміри частинок, групи поверхні, розміри пор і співвідношення Si/Al, можуть бути адаптовані таким чином, щоб можна було досягти кращих аналітичних характеристик біосенсорів.

**Ключові слова:** уреаза, глюкозооксидаза, кондуктометричний біосенсор, цеоліти, коїмобілізація ферментів