

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 543.06:577.15:543.553

DOI: 10.18524/1815-7459.2023.1.275947

РОЗРОБКА КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО АРГІНІН-ЧУТЛИВОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ АРГІНІНДЕІМІНАЗИ

*К. О. Беркета¹, О. Я. Саяпіна¹, Л. Р. Фаюра², А. А. Сибірний^{2,3},
С. В. Дзядевич¹, О. О. Солдаткін¹*

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, 03143,
вул. Заболотного-150, м. Київ, Україна

² Інститут біології клітини НАН України, 79005, вул. Драгоманова 14/16 м. Львів, Україна

³ Жешувський університет, вул. Зельверовича 4, 35–601, м. Жешув, Польща

ksenya.berketa.10@gmail.com; osayapina4@gmail.com; fayural@gmail.com; sibirny@yahoo.com;
dzyad@yahoo.com; soldatkinsasha@gmail.com

РОЗРОБКА КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО АРГІНІН-ЧУТЛИВОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ АРГІНІНДЕІМІНАЗИ

К. О. Беркета, О. Я. Саяпіна, Л. Р. Фаюра, А. А. Сибірний, С. В. Дзядевич, О. О. Солдаткін

Анотація. В роботі розроблено аргінін-чутливий кондуктометричний біосенсор. Як кондуктометричний перетворювач використовували дві пари золотих гребінчастих електродів, нанесених на ситалову підкладинку. Для створення біоселективної мембрани використовували фермент аргініндеїміназу, яку іммобілізували шляхом ковалентного зшивання глутаровим альдегідом на чутливу поверхню однієї пари електродів кондуктометричного перетворювача, на другу пару електродів наносили референтну мембрану на основі бичачого сироваткового альбуміну. Визначено оптимальні умови іммобілізації ферменту. Вивчено вплив параметрів розчину (іонна сила, буферна ємність, рН та концентрація білка) на роботу розробленого біосенсора. Досліджено стабільність функціонування та зберігання запропонованого біосенсора. Вивчено селективність біосенсора та його основні аналітичні характеристики (мінімальна границя визначення, лінійний та динамічний діапазон роботи біосенсора тощо). Показано, що розроблений біосенсор є перспективним для кількісного визначення вмісту аргініну в реальних зразках.

Ключові слова: біосенсор, кондуктометричний перетворювач, аргініндеїміназа, аналіз L-аргініну, іммобілізація ферменту

DEVELOPMENT OF CONDUCTOMETRIC ARGININE-SENSITIVE BIOSENSOR BASED ON ARGININE DEIMINASE

K. O. Berketa, O. Y. Saiapina, L. R. Fayura, A. A. Sibirny, S. V. Dzyadevych, O. O. Soldatkin

Abstract. An arginine-sensitive conductometric biosensor was developed. Two pairs of gold interdigitated electrodes deposited on the ceramic substrate were used as a conductometric transducer. Arginine deiminase was used to create a bioselective membrane. The enzyme was immobilized on the sensitive surface of one pair of electrodes of the conductometric transducer by covalent crosslinking with glutaraldehyde; a reference membrane based on bovine serum albumin was deposited on the second pair of electrodes.

The optimal conditions of enzyme immobilization (enzyme concentration, duration and method of immobilization) were determined. The influence of solution parameters (ionic strength, buffer capacity, pH and protein concentration) on the operation of the developed biosensor was studied as well as stability of its functioning and storage. The biosensor selectivity and main analytical characteristics (detection limit, linear and dynamic ranges of the biosensor operation etc.) were investigated. The proposed biosensor was shown to be promising for the quantitative determination of arginine content in real samples.

Keywords: L-arginine, biosensor, conductometric transducer, arginine deiminase, enzyme immobilization

ВСТУП

Точне, швидке та вибіркоче визначення окремих компонентів амінокислотного складу функціональних харчових продуктів, харчових добавок та продуктів для спеціального харчування є важливим для розробки ефективних методів контролю якості. Продукти харчування, збагачені L-аргініном, набули широкого поширення за останні 10–15 років завдяки доведеній ефективності використання підвищених доз L-аргініну для поліпшення стану здоров'я та лікування ряду функціональних розладів організму [1–3]. Зокрема, було виявлено можливість використання L-аргініну для посилення позитивних ефектів від лікування ендотеліальної дисфункції атеросклерозу серцевої, церебральної та периферичної судин, гіпертонії (артеріальної, легеневої, ниркової), захворювань печінки, цукрового діабету, ожиріння, імунодефіциту, остеоартрозу тощо. [4–9]. Окрім того, що він є важливим компонентом білків, аргінін відіграє надзвичайно важливу роль в організмі, оскільки він також є попередником таких сполук, як сечовина, пролін, глутамат, креатин, агматин, оксид азоту (сигнальна сполука, яка забезпечує передачу нейронів, розширення судин, цитотоксичність

та інші функції). Підраховано, що добова потреба аргініну для здорової дорослої людини становить близько 5–6 грамів [10]. Найпоширеніші джерела отримання L-аргініну з їжею – це насіння рослин, зародки пшениці, овес, бобові (соя, горох, квасоля), м'ясо (качка, гусак, вівця), горіхи (волоський горіх, кедрові горішки, кокос, фундук, фісташки), молочні продукти і морепродукти.

При незначному дефіциті організм здорової людини може синтезувати достатню кількість аргініну самостійно. Однак при різних порушеннях та старінні цю здатність організм втрачає, через що суттєво зростає потреба в насичених аргініном продуктах. У ряді джерел зазначено використання підвищених доз аргініну (від 3 до 9 г і навіть до 16 г на добу курсом від 2 тижнів до 6 місяців) з лікувальною метою [11]. Оскільки ринок пропонує широкий вибір місцевих та імпортованих функціональних продуктів з природним високим вмістом аргініну (наприклад, насіння кунжуту, гарбуза чи коноплі), а також харчові добавки на основі аргініну, які, як стверджує виробник, приносять користь для здоров'я, необхідні надійні, швидкі та доступні методи контролю якості продукції та концентрації в них аргініну.

Методи кількісного та якісного визначення аргініну беруть свій початок з класичного хімічного аналізу на основі α -нафтолу та гіпохлориту [12] або гіпоброміту та оксину (8-гідроксихіноліну) [13,14]. Наразі існує широкий спектр методів визначення аргініну: спектрофотометричне [15,16], флуориметричне [17] та хемілюмінесцентне [18] виявлення, іонообмінна та високоефективна рідинна хроматографія [19,20], капілярний електрофорез [21], мас-спектрометрія [22] та ферментні аналізи [23–25]. Відомі ферментативні аналізи зазвичай використовують одинарне або багаторазове ферментне перетворення аргініну з використанням аргінази, уреазы та глутаматдегідрогенази [23], аргініносукцинатсинтази, піруватфосфатдікінази, піруватоксидази та пероксидази хрому, ауреаргінази [24] або аргініндеімінази [25].

Незважаючи на задовільні критерії аналітичної ефективності, використання вищезазначених методів для складних матриць, таких як харчові продукти та дієтичні добавки, часто пов'язане з тривалою попередньою обробкою зразків, яка виконується кваліфікованим персоналом з використанням дорогого та громіздкого обладнання і коштовних реагентів. Ферментативні методи, хоча і є відносно простими, все ж вимагають автономного виявлення з використанням часто нестабільних хромогенних сполук або флуорофорів.

Таким чином, розробка нових методів для відповідності вищезазначеним вимогам може значно спростити аналіз таких зразків і залишається пріоритетним міждисциплінарним завданням у комплексній процедурі контролю якості харчових продуктів та дієтичних добавок, що використовуються для профілактики та/або усунення дефіциту аргініну.

Електрохімічні біосенсори можуть бути одним із перспективних методів для таких цілей, оскільки вони мають ряд переваг над звичайними аналітичними методами: вони є більш простими у використанні, недорогі, портативні та сумісні з різними лабораторними умовами; характеризуються коротким часом аналізу зразка і зазвичай не вимагають (або вимагають мінімальної) попередньої обробки зразка.

На сьогодні можна знайти відомості про розроблені біосенсори для визначення аргініну на основі одного або кількох ферментів (аргініндеіміназа, аргіназа, уреазы, L-аргініндекарбоксілаза) та різних перетворювачів (амперометричних, потенціометричних, кондуктометричних) [27].

Багатоферментні біосенсори для визначення аргініну мають ряд недоліків, найбільш істотним з яких є їхня не абсолютна селективність до цільового аналізу, яка виникає внаслідок позитивної реакції ферментного комплексу на сполуки гуанідину, сечовину тощо. Також, якщо використовується каскад з кількох ферментів, збільшується вартість біосенсора і ускладнює приготування його біоселективних елементів. З огляду на тип перетворювачів, які можуть використовуватися в біосенсорах, слід зазначити, що саме кондуктометричні перетворювачі надають додаткові переваги в електрохімічних біосенсорах. У порівнянні з іншими типами електрохімічних біосенсорів, які виготовляються за мікросистемними технологіями, кондуктометричні біосенсори не потребують використання дорогого і технологічно складного електрода порівняння; вони працюють на змінній напрузі низької амплітуди, що запобігає фарадеївським процесам на електродах; біосенсори світлонечутливі і їх робочий потенціал може бути знижений, що значно знижує споживання енергії. Крім того, кондуктометричні перетворювачі мають нижчу вартість, оскільки вони можуть бути виготовлені за допомогою недорогої тонкоплівкової стандартної технології, та придатні для мініатюризації [28].

Порівнюючи аналітичні характеристики існуючих біосенсорів для визначення аргініну, ми виявили, що кондуктометричний біосенсор на основі аргінази та уреазы [29] характеризувався однією з найнижчих меж виявлення, найширшим лінійним діапазоном та найкращою стабільністю роботи та зберігання, що важливо для застосування біосенсорів в аналізі реальних зразків. Зазначений біосенсор успішно застосовувався для кількісного визначення L-аргініну у фармацевтичних зразках. У той же час він мав недостатню селективність до аргініну у присутності інших амінокислот при ро-

боті в багатокомпонентних середовищах, таких як фруктові соки. Саме це обмеження спонукало авторів шукати інші рішення. Очевидно, що використання біоселективного елемента, який може забезпечити максимально можливу або абсолютну селективність до субстрату, завжди є вигідним для кількісного аналізу незалежно від природи зразка, що аналізується. Одним із можливих шляхів підвищення селективності біосенсорного аналізу може бути застосування одноферментного підходу. Коли біоселективний елемент біосенсора створюється на основі одного ферменту, легше контролювати чутливість біосенсора, його стабільність при зберіганні та інші важливі аналітичні характеристики шляхом налаштування каталітичної активності та інших властивостей ферменту, які визначають функціонування біосенсора.

У цій роботі ми пропонуємо новий кондуктометричний біосенсор для визначення L-аргініну на основі рекомбінантної аргініндеїмінази (АДІ), яка розкладає аргінін до амоніак-йону відповідно до реакції:

АДІ (Е.С. 3.5.3.6)



У такому біосенсорі кондуктометричний перетворювач реєструє зміну активної провідності розчину через утворення іонів NH_4^+ , які мають високу іонну рухливість у водних розчинах.

Для розробки біосенсора ми використали високостабільну АДІ від *Mycoplasma hominis*. Повідомлена раніше процедура виробництва *M. hominis* АДІ [30], експресовано в *E. coli*, призвела до його високої вартості, тому необхідне було вдосконалення процедури виробництва. Для цієї роботи було сконструйовано рекомбінантний штам *E. coli*, який надекспресує ген *M. hominis*, що кодує АДІ. Розроблено протокол високорівневого виробництва АДІ на дешевому мінеральному середовищі. В результаті були отримані стабільні ферментні препарати з питомою активністю 30–34 од.акт./мг білка. Ферментні препарати, які зазвичай отримують за описаною проце-

дурою, зберігали свою специфічну активність протягом 5 років при зберіганні при 4 °С.

Метою роботи була розробка стабільного та високочутливого біосенсора на основі АДІ, який був би застосовний для селективного визначення L-аргініну в реальних зразках. Розробка включала виготовлення рекомбінантної АДІ, оптимізацію часу іммобілізації АДІ в селективному елементі біосенсора та пошук параметрів робочого буфера, оптимальних для роботи біосенсора. Досліджено аналітичні характеристики біосенсора в оптимізованому буферному розчині; оцінено селективність, відтворюваність сигналу, експлуатаційну та стабільність зберігання розробленого біосенсора. Розроблений біосенсор був апробований в аналізі аргініну в харчових добавках.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Матеріали

Для створення біосенсора було використано фермент рекомбінантна аргініндеїміназа з *Escherichia coli* (АДІ) з активністю 147 од.акт./мл, що був люб'язно наданий Інститутом біології клітини НАН України. Бичачий сироватковий альбумін (фракція V) (БСА) та 25% водний розчин глутарового альдегіду (ГА) було отримано від фірми Sigma-Aldrich (США). Як стоковий розчин субстрату використовували 200 мМ розчин L-аргініну фірми Sigma-Aldrich (Німеччина). Для аналізу селективності біосенсора використовували: L-валін, L-глутамін, L-цистеїн, L-метіонін, L-серин, L-аланін, L-гліцин, L-ізолейцин, L-треонін, L-гістидин, L-аспарагін, L-пролін, L-фенілаланін, аскорбінову кислоту, лимонну кислоту, L-триптофан, L-аспарагінову кислоту, L-лізин та L-глутамінову кислоту фірми Sigma-Aldrich (Німеччина). Для виготовлення буферного розчину використовували KH_2PO_4 , отриманий від фірми Helicon (Росія). Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «х.ч.» та «ч.д.а.».

Кондуктометричні перетворювачі

В роботі використано кондуктометричні перетворювачі розміром 5 мм x 30 мм, які

складаються з двох ідентичних пар золотих гребінчастих електродів, що нанесені на ситалову підкладку. Ширина пальців гребінчастих електродів та зазор між ними – 20 мкм, а загальна площа чутливої поверхні пари електродів приблизно 1,5 мм². Використання системи із двох пар електродів полягає в необхідності проводити вимірювання в диференційному режимі, коли на одну пару електродів наносять чутливу мембрану на основі ферменту АДІ, а на іншу – референтну на основі бичачого сироваткового альбуміну. При цьому загальна концентрація білків в обох мембранах має бути однаковою. Така методика вимірювання дозволяє суттєво зменшити вплив загальної провідності розчину, світла, температури та інших неінформативних параметрів на результати вимірювання.

Стационарна установка для кондуктометричних досліджень

Для проведення кондуктометричних вимірювань, з низькочастотного генератора сигналів ГЗ–118 на диференційну пару кондуктометричних електродів подавалась змінна напруга з частотою 100 кГц та амплітудою 10 мВ. Електроди були занурені у досліджуваний розчин. Для підвищення чутливості сенсора та мінімізації шумів, що виникають за рахунок загальної провідності розчину, застосовувався диференційний режим вимірювання. Отриманий на електродах сигнал знімався з опорів навантаження $R_n = 1$ кОм та надходив через диференційний підсилювач «Unipan-233–6» на селективний нановольтметр «Unipan-232–В». Після вольтметру сигнал подавався на реєструючий самописець «АВВ Metrawatt SE120». Технічні деталі наведені в роботі [31].

Експресія та виділення аргініндеїмінази

Експресію, ренатурацію та очищення АДІ проводили, як повідомлялося раніше з деякими модифікаціями [32]. Клітини *E. coli* BL21 (DE3) fhuA2 [lon] ompT gal (λ sBamHI Δ EcoRI–В int::(lacI:: PlacUV5:: ген Т7) i21 Δ nin5) [dcm] Δ hdsS [33] були трансформовані плазмідною рЕТ3d-ADІ (*Mycoplasma hominis*). Трансформанти відбирали на середовищі Лурія–Бертані при 37 °С, що містило 18 г/л

агару, 100 мг/л ампіциліну, 0,2% аргініну та 0,5% глюкози. Відібрані трансформанти культивували у середовищі С-750501, яке містило 1,25% гліцерину та 0,01% лактози згідно раніше модифікованого протоколу автоіндукції [30].

Індуковані клітини збирали за допомогою центрифугування (15 хв при 5000 \times g та 4 °С), промивали 20 мМ натрій фосфатним буфером, рН 7,2 і зберігали при –70 °С. Для отримання суспензії мікротілець включень, що містили АДІ, біомасу бактерій ресуспендували в 50 мМ Tris-HCl буфері, рН 7,8, що містив 1 мМ ЕДТА та 0,2% лізоцим та інкубували, як описано раніше. Осад, що містив мікротілець включень осаджували та промивали 20 мМ фосфатним буфером рН 7,2, що містив 1 мМ ЕДТА, 4% тритон Х-100. Денатурацію, ренатурацію та очистку АДІ проводили, як це було описано раніше [32].

Після очистки АДІ концентрували за допомогою ультрафільтраційної спінової колонки Vivaspin-Turbo 15 (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Німеччина), стерилізували за допомогою фільтрів 0,22 мкм (CE0459 MILLEX-GV, MILLIPORE, США) і зберігали при 4°С.

Концентрацію білка визначали методом Лоурі. Активність АДІ визначали, як описано [32]. За одну одиницю активності (U) приймали кількість ферменту, який перетворює 1 мкмоль L-аргініну в L-цитрулін за хвилину при 37 °С.

Виготовлення біоселективних мембран (імобілізація ферменту)

Біоселективні мембрани отримували шляхом ковалентного зв'язування аргінінідеїмінази з бичачим сироватковим альбуміном (БСА) на поверхні однієї пари електродів кондуктометричного перетворювача. Зшиваючим агентом слугував глутаровий альдегід (ГА). Ферментний гель, що наносився на одну пару електродів, в своєму складі містить 88,2 од.акт./мл АДІ, 2% БСА, 6,7% гліцерину в 25 мМ фосфатному буфері з рН 6,2. Референтну мембрану отримували нанесенням на другу пару електродів гелю, що складається з 2% БСА, 6,7% гліцерину в 25 мМ фосфатному буфері із рН 6,2. Імобілізація проводилася

в ексикаторі в парах глутарового альдегіду, для цього кондуктометричний перетворювач з нанесеними мембранами поміщали в ексикатор на 30 хвилин. Після іммобілізації перетворювач виймали з ексикатора, підсушували на повітрі впродовж 10 хвилин. Далі біосенсиори промивали в робочому буфері впродовж 5 хвилин, декілька разів змінюючи буфер, для звільнення мембран біосенсора від незв'язаних компонентів.

Методики біосенсорних вимірювань

Вимірювання проводились за кімнатної температури, у відкритій комірці об'ємом 2 мл при постійному перемішуванні. Для роботи був обраний 5 мМ фосфатний буферний розчин з рН 6,2. Концентрацію субстратів в комірці задавали додаванням до робочого буферу порцій стандартних концентрованих вихідних розчинів субстрату. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з впливом коливання температури, рН середовища, електричними наводками, подавлялись завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань.

Всі розрахунки проводились в програмі OriginLab OriginPro 8.5.

Результати та обговорення

Принцип функціонування кондуктометричного біосенсора на основі АДІ для визначення аргініну

В основі роботи біосенсора для визначення L-аргініну лежить ферментативна реакція за участі аргініндеімінази, зображена на рис. 1а. АДІ – фермент класу гідролаз, який каталізує реакцію незворотного гідролізу L-аргініну до L-цитруліну та аміаку. Таким чином, в ході ферментативної реакції утворюються нові йони, що призводить до зміни електропровідності розчину в приелектродному просторі біосенсора, яку і фіксує кондуктометричний перетворювач.

На рис. 1б наведений типовий відгук біосенсора на добавку 1,5 мМ L-аргініну, отриманий на стаціонарній вимірювальній установці. З графіку, що відтворюється реєструвальним пристроєм, можна визначити не тільки величину відгуку біосенсора на певну концентрацію субстрату, а й час його отримання, шум та дрейф базової лінії, а також кутовий коефіцієнт відгуку. Все це дає можливість розраховувати теоретично можливі відгуки на добавку інших

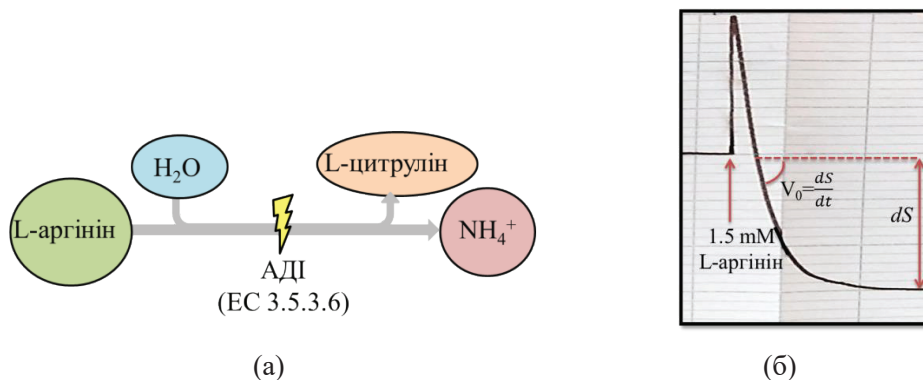


Рисунок 1. Схема ферментативної реакції (а) та типовий відгук (б).

концентрацій для аналізу без побудови калібрувальних кривих.

Підбір оптимальних параметрів іммобілізації ферменту

Важливим завданням при розробці будь-якого біосенсора є визначення оптимальних параметрів процесу іммобілізації задля досягнення максимальної ефективності роботи іммобілізованого ферменту. Одним з головних

параметрів іммобілізації, що обов'язково вивчають під час розробки біосенсора, є її тривалість. Оптимізація даного параметру забезпечує найбільшу чутливість і стабільність роботи та збереження біосенсорів. Недостатній час витримки ферменту із зшиваючим агентом в ексикаторі призведе до зменшення стабільності функціонування біосенсора, а надлишковий час – до зниження його чутливості (вна-

слідок зашивки активного центру ферменту). Відповідно, в роботі було перевірено вплив тривалості іммобілізації на ефективність роботи біосенсора. Результати дослідження наведені на рис. 2. Оптимальним часом іммобілізації

ферментної мембрани в парах глутарового альдегіду є 30 хвилин.

Ще одним дуже важливим параметром іммобілізації ферментів при розробці біосенсора є активність ферменту в складі біосе-

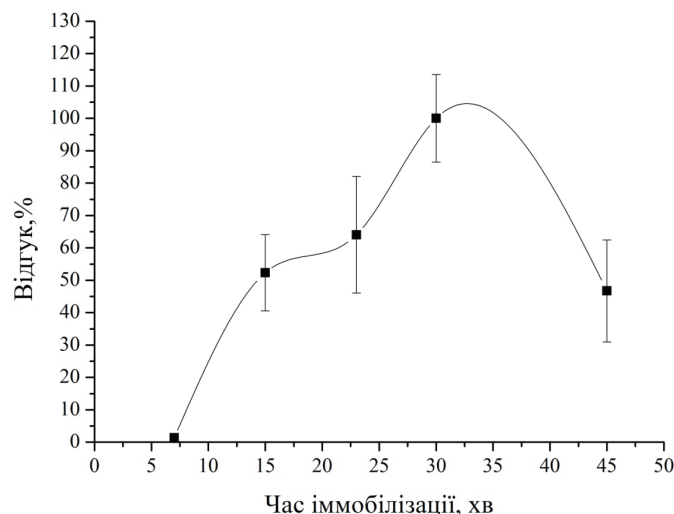


Рисунок 2. Залежність величини відгуку біосенсора від тривалості іммобілізації ферменту. Концентрація L-аргініну – 1,5 мМ. Дослідження проводились в 5 мМ фосфатному буфері за рН 7,35.

лективного елементу. Препарат ферменту, що нам було люб'язно надано Інститутом біології клітини НАН України, мав базову активність 147 од.акт/мл в розчині. В роботі ми дослідили як зміна активності ферменту в гелі для іммобілізації буде впливати на чутливість біо-

сенсора до аргініну. Для підбору оптимальної концентрації АДІ ми виготовляли біоселективні елементи з розчинів із концентрацією ферменту 14,7 од.акт/мл, 29,4 од.акт/мл, 58,8 од.акт/мл, 88,2 од.акт/мл та 117,6 од.акт/мл. Результати експерименту наведені на рис.3. Як

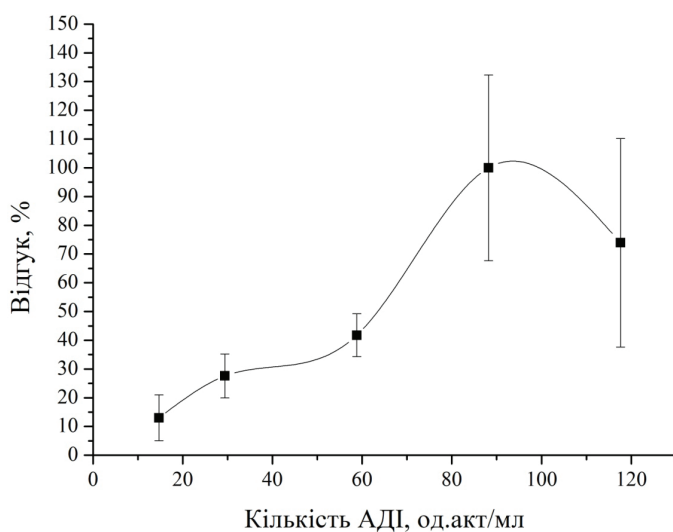


Рисунок 3. Залежність величини відгуків біосенсора від концентрації АДІ. Концентрація L-аргініну – 1,5 мМ. Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері за рН 6,2.

можемо побачити, при концентрації ферменту в 14,7 од.акт/мл, 29,4 од.акт/мл та 58,8 од.акт/мл відгуки на L-аргінін є низькими, а при концентрації АДІ 88,2 од.акт/мл та 117,6 од.акт/мл відгуки є достатніми для вимірювання. Для подальшої роботи нами була обрана концентрація в 88,2 од.акт/мл з метою економії ферменту.

Дослідження впливу параметрів розчину на функціонування біосенсора

Відомо, що робота будь-якого біосенсора є залежною як від характеристик самого біосенсора, так і від характеристик розчину, в якому плануються вимірювання. Відповідно в нашій роботі необхідно було дослідити, як впливають основні характеристики розчину на функціонування розробленого біосенсора на основі АДІ.

Звісно, кожний фермент має рН оптимум роботи, але відомо, що після іммобілізації цей оптимум може змінюватись, тому необхідно було дослідити вплив рН розчину на роботу аргінін-чутливого біосенсора. Для його визначення було проведено ряд експериментів

з використанням 2-х типів буферних розчинів: 5 мМ фосфатного та 2,5 мМ Polymix з різними рН. Polymix буфер застосовувався для дослідження рН оптимуму роботи біосенсора, оскільки цей буфер є багатосольовим і характеризується однаковою буферною ємністю в широкому діапазоні рН. Фосфатний буфер було використано для аналізу залежності роботи біосенсора від рН, оскільки саме з цим буфером планувалась подальша робота біосенсора з реальними зразками. Роботу біосенсора перевіряли у фосфатному буфері в діапазоні рН від 5,5 до 8,0, а для Polymix – від 5,03 до 9,11. Результати експериментів ви можете побачити на рис. 4. Як видно з рис. 4а найвища величина відгуку біосенсора спостерігалась при роботі в Polymix за рН 5,35. А з рис.4б видно, що найбільший відгук біосенсора на 1,5 мМ аргініну спостерігався у фосфатному буфері за рН 6,0. Проте, внаслідок того, що при рН 6,0 фосфатний буфер має низькі буферні властивості, для подальшої роботи був обраний буфер з рН 6,2.

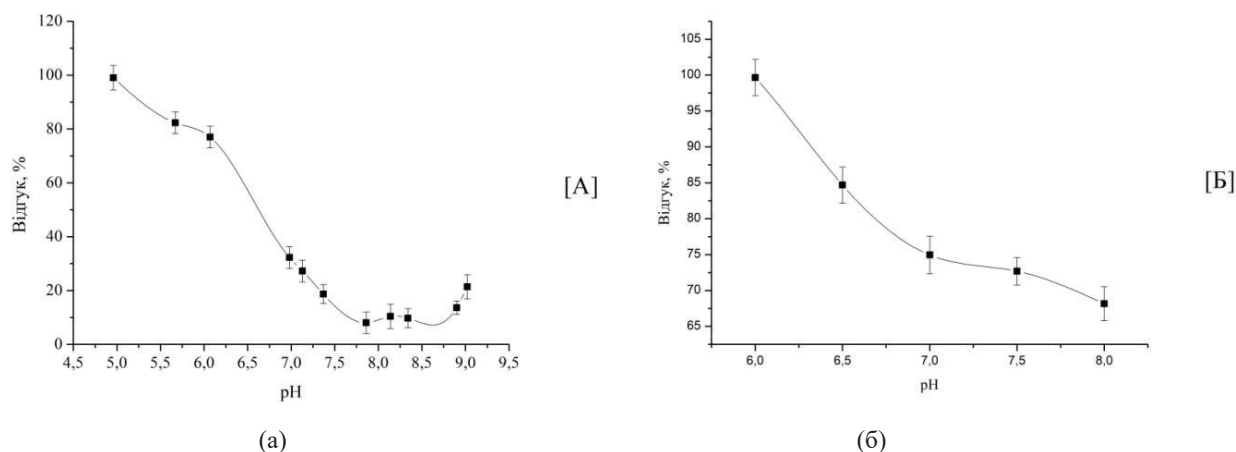


Рисунок 4. Залежність величини відгуків біосенсора від рН робочого буферного розчину. Концентрація L-аргініну – 1,5 мМ. Дослідження проводились в 2,5 мМ Polimix буфері (а) та 5 мМ фосфатному буфері (б).

Робота кондуктометричних біосенсорів є сильно залежною від іонної сили буферного розчину. Іонна сила (як і фонові провідність розчину) може зростати внаслідок збільшення буферної ємності. Також, при вимірюванні реальних зразків, іонна сила може змінюватись внаслідок додавання досліджуваного зразка (в нашому випадку – складних діабетичних

добавок, речовини в складі яких можуть змінювати провідність). Відповідно, обов'язковим є дослідження впливу іонної сили розчину на роботу розробленого кондуктометричного біосенсора для визначення аргініну.

Ми перевірили чутливість біосенсора до аргініну за різної іонної сили буферного розчину (рис.5). Іонну силу розчину змінювали

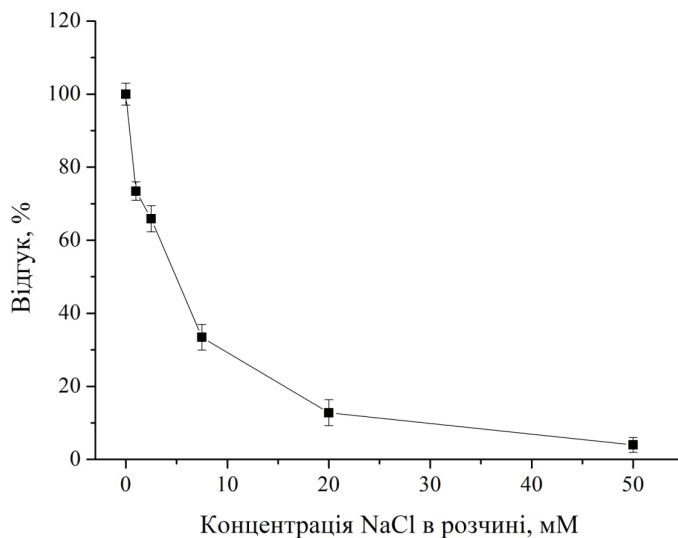


Рисунок 5. Залежність величини відгуку біосенсора від зміни іонної сили розчину (концентрації NaCl в розчині). Концентрація L-аргініну – 1,5 мМ. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері за рН 6,2.

додаванням до буферу NaCl з концентрацією від 0 мМ до 50 мМ.

З графіку, побудованого на основі результатів вимірювання видно, що із зростанням іонної сили розчину за експонентою зменшується відгук на субстрат. В основному така залежність спостерігається за рахунок зростання фонові провідності розчину. Саме тому, важливо проводити контроль іонної сили при роботі з кондуктометричними біосенсорами,

особливо при використанні їх для аналізу реальних фармацевтичних зразків.

Наступним параметром розчину, який слід враховувати при роботі з кондуктометричними біосенсорами є буферна ємність розчину. Тому були проведені вимірювання чутливості біосенсора до аргініну при роботі в фосфатних буферних розчинах з різною буферною ємністю (від 1 мМ до 20 мМ) (рис.6). Аналізуючи калібрувальні графіки, можна поба-

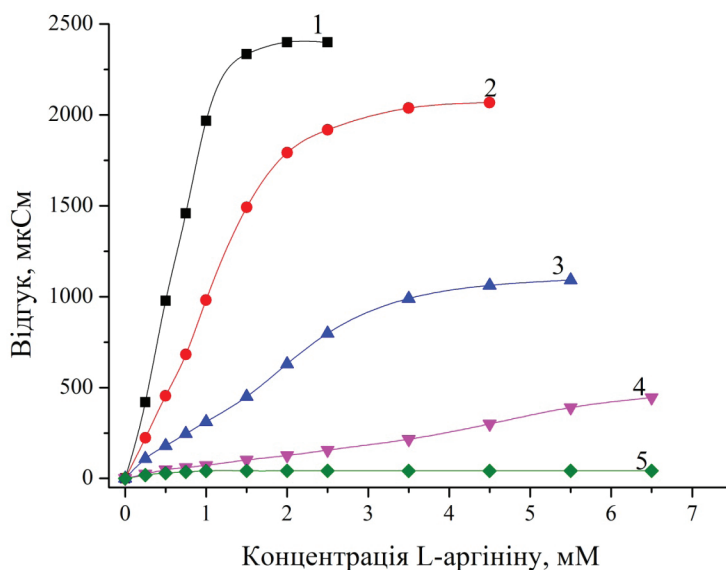


Рисунок 6. Залежність величини відгуків біосенсора від буферної ємності розчину. Дослідження проводились в 1 мМ (1), 2,5 мМ (2), 5 мМ (3), 10 мМ (4) та 20 мМ (5) фосфатному буфері за рН 7,35.

чити, що найбільші відгуки спостерігались при роботі біосенсора в 1 мМ ФБ, проте при вимірюваннях з використанням буферів з буферною ємністю 1 та 2,5 мМ спостерігались збільшені, порівняно з попередніми вимірюваннями, шуми, що досить сильно впливає на стабільність роботи біосенсора. Цей ефект можна пояснити тим, що низька концентрація солей в буферному розчині не може підтримувати його буферні властивості. При збільшенні буферної ємності робочого розчину суттєво зменшуються відгуки біосенсора на субстрат та розширюється лінійний діапазон роботи біосенсора, тому для подальшої роботи був обраний буфер з буферною ємністю 5 мМ.

Майже у всіх біологічних рідинах присутня висока концентрація білкових молекул, які при роботі можуть фізично забивати біоселективну мембрану, погіршуючи її проникність. Внаслідок цього ускладнюється дифу-

зія ферменту до активного центру субстрату і відгук сенсора падає. Ми провели ряд експериментів на дослідження впливу концентрації бичачого сироваткового альбуміну в розчині на величину відгуку біосенсора (рис.7). Концентрація білка варіювалась в межах від 0 до 3%. В ході експерименту додавали у вимірювальну комірку таку аліквоту L-аргініну, щоб концентрація субстрату в комірці дорівнювала 1,5 мМ. Таким чином, при підвищенні концентрації білка в розчині суттєво падала величина відгуку. Так, при концентрації білка в 3% відгук біосенсора зменшився більш ніж на 90%.

Таким чином, можна зробити висновок, що функціонування біосенсора є сильно залежним від концентрації білка і його використання не рекомендується для вимірювання вмісту аргініну у зразках з високою концентрацією білка.

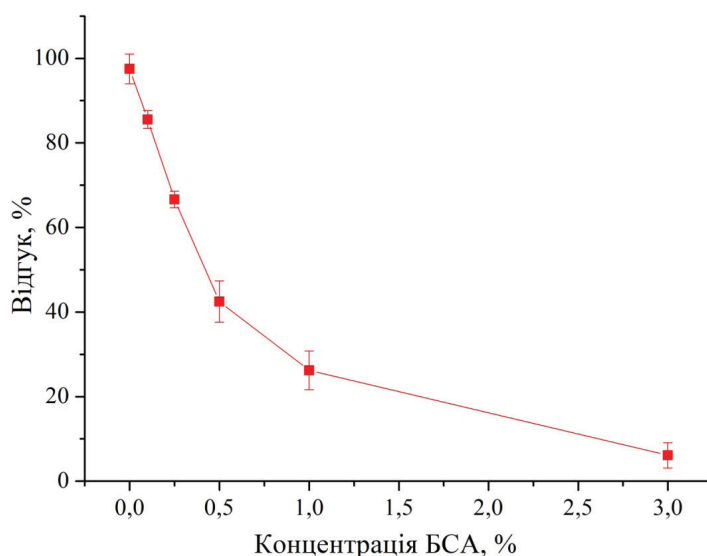


Рисунок 7. Залежність величини відгуку біосенсора від концентрації білка в розчині (концентрація БСА). Концентрація L-аргініну – 1,5 мМ. Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері за рН 6,2.

Вивчення стабільності функціонування та зберігання розробленого біосенсора на основі АДІ

Дуже важливою характеристикою біосенсора є відтворюваність сигналів при безперервній роботі. Тому ми дослідили відгуки біосенсора на однакову концентрацію субстрату впродовж декількох годин. Тривалість

отримання одного відгуку складала 1–1,5 хвилини, часовий проміжок між вимірюваннями – 5 хвилин, за цей час біосенсор відмивали від субстрату, декілька разів змінюючи буфер у вимірювальній комірці при постійному перемішуванні. Відгуки отримували на 1,5 мМ L-аргініну (концентрація, що відповідає діапазону насичення калібрувальної кривої). Ре-

зультати вимірювання наведено на рис.8. За 12 вимірювань суттєвого падіння величини відгуку не спостерігалось, а відносне середньоквадратичне відхилення становило 6,1%.

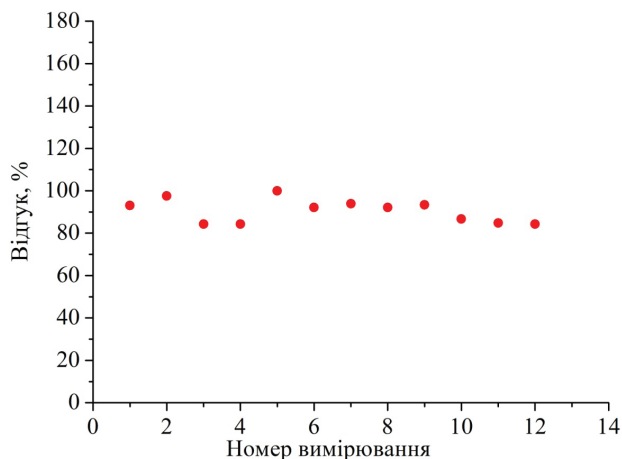


Рисунок 8. Відтворюваність відгуків біосенсора на основі АДІ при безперервній роботі. Концентрація L-аргініну – 1,5 мМ. Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері за рН 6,2.

Ще однією важливою характеристикою будь-якого біосенсора є операційна стабільність роботи (рис. 9).

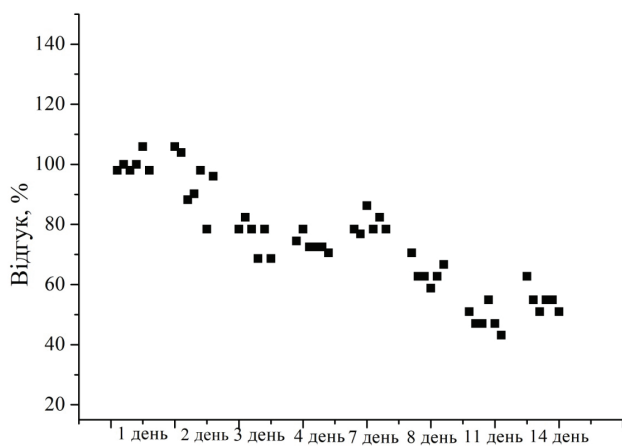


Рисунок 9. Операційна стабільність відгуків біосенсора на основі АДІ впродовж 14 днів. Концентрація L-аргініну – 1,5 мМ. Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері за рН 6,2.

Дослідження проводили впродовж двох тижнів, кожного дня, отримували по 6 відгуків біосенсора на 0,25 мМ L-аргініну. Між вимірюваннями біосенсор зберігався в сухому стані

в холодильнику за температури + 8 °С. Після першого тижня роботи біосенсора, середня величина відгуку зменшилась на 20%, а після завершення експерименту (по проходженні двох тижнів) – на 45%. Таким чином, було показано, що біосенсор є досить стабільним при постійному використанні та характеризується гарною операційною стабільністю сигналів, щонайменше протягом двох тижнів.

З метою подальшої комерціалізації розробленого біосенсора, було вивчено стабільність біосенсора на основі АДІ при довгостроковому зберіганні (рис. 10).

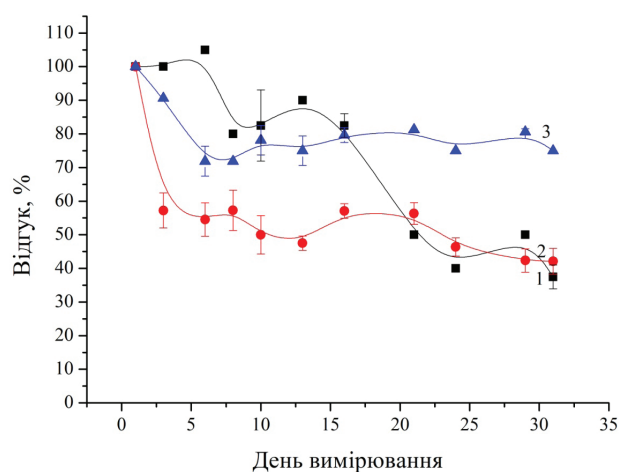


Рисунок 10. Стабільність біосенсора при довготривалому зберіганні в різних умовах: в сухому стані при +8 °С (1), у вологому стані при +8 °С (2) та у сухому стані при –18 °С (3). Концентрація L-аргініну – 1,5 мМ. Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буфері за рН 6,2.

Експеримент проводили наступним чином: виготовили низку біосенсорів, отримали по декілька відгуків на однакову концентрацію субстрату для кожного з них, після чого помістили в різні умови для зберігання: у вологому стані при +8 °С та в сухому стані при +8 °С та –18 °С. Експеримент тривав 31 день. По проходженні першого тижня суттєво зменшились відгуки на всіх досліджуваних біосенсорах. Після другого та третього тижнів відгуки біосенсорів, що зберігались в у вологому стані при +8 °С; та у сухому стані при –18 °С залишались відносно стабільними, в той час, як відгук біосенсора, що зберігався в сухому стані при +8 °С, зменшився на 60% відносно початкової

активності. Після завершення експерименту відгук біосенсора, що зберігався у сухому стані при -18°C , становив приблизно 80% від початкового рівня сигналу. Відгук біосенсора, що зберігався у вологому стані при $+8^{\circ}\text{C}$ продовжував зменшуватися (після 31 дня відгук дорівнює близько 40% від початкового), а величина відгуку біосенсора, що зберігався при $+8^{\circ}\text{C}$ у сухому стані становила приблизно 35% відносно початкової активності. Найкращі результати виявились при зберіганні біосенсора у сухому стані при -18°C .

Перевірка селективності роботи біосенсора на основі АДІ

Одним з найважливіших критеріїв аналізу перспективності застосування біосенсора, для подальшої роботи з реальними зразками, є його селективність відносно можливих інтерферуючих речовин. Було проведено низку дослідів з метою перевірки селективності розробленого біосенсора на основі АДІ. Спершу було перевірено як інші амінокислоти впливають на селективність біосенсора до аргініну (табл. 1).

Таблиця 1.

Селективність біосенсора відносно можливих інтерферентів. Концентрація усіх аналітів – 100 мкМ. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері за рН 6,2.

<i>Інтерферуючі речовини</i>	<i>Відгук біосенсора, %</i>
Триптофан	0
Фенілаланін	0
Пролін	0
Гістидин	0
Треонін	0
Ізолейцин	0
Гліцин	0
Аланін	0
Серин	0
Метіонін	0
Цистеїн	0
Валін	0
Аспарагін	0
Глутамін	0
Лізін	6,67
Аспарагінова кислота	20
Глутамінова кислота	20
Аргінін	100

Дослідження проводились в 5 мМ фосфатному буфері за рН 6,2, при цьому у вимірвальну комірку вносились аліквоти концентрованих розчинів можливих інтерферуючих речовин (інші амінокислоти) до концентрації в 100 мкМ в комірці. Відгук біосенсора на інші амінокислоти розраховувався у відсотках, при цьому за 100% був взятий відгук на 100 мкМ L-аргініну. В цілому біосенсор виявився досить селективним до інших амінокислот, що можуть входити до складу фармацевтичних зразків, окрім аспарагінової та глутамінової кислоти (реакція біосенсора – 20%).

Крім того було перевірено селективність кондуктометричного біосенсора на основі АДІ відносно низки інших електроактивних речовин, що можуть бути присутні в біологічних зразках. Біосенсор був селективним відносно цих інтерферуючих речовин, за виключення аскорбінової та лимонної кислот. Величина відгуку біосенсора на лимонну кислоту становила 133,3%, а на аскорбінову – 53,3% у порівнянні з відгуком даного біосенсора на L-аргінін. Відповідно, наявність цих кислот у реальному зразку може спотворити результат біосенсорного аналізу концентрації L-аргініну в зразку, тому застосування розробленого біосенсора для аналізу реальних зразків, в яких є аскорбінова або лимонна кислота, є неможливим.

Аналіз основних аналітичних характеристик розробленого біосенсора

Останнім етапом створення та оптимізації роботи біосенсора на основі аргініндемінази для детектування аргініну було визначення його основних аналітичних характеристик. Для виконання цього завдання було побудовано калібрувальну криву визначення концентрації L-аргініну (рис. 11).

Проаналізувавши характер відгуків та калібрувальну криву біосенсора, отриманих після усіх оптимізацій, було визначено основні аналітичні характеристики біосенсора (рис. 11). Мінімальну границю біосенсорного визначення L-аргініну вимірювали як мінімальну концентрацію субстрату, на яку є можливим отримати відгук, що перевищує шум базової лінії в три рази. Таким чином, мінімальна гра-

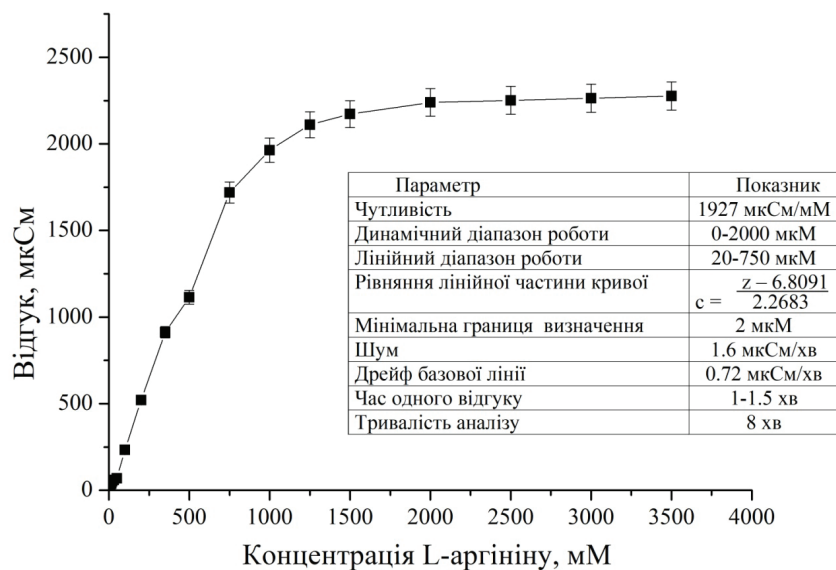


Рисунок 11. Калібрувальна крива біосенсора на основі АДІ. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері за рН 6,2.

ниця визначення для розробленого біосенсора становила 2 мкМ. Лінійний діапазон роботи біосенсора лежить в межах від 20 до 750 мкМ L-аргініну, а динамічний – від 0 до 2000 мкМ. Лінійна ділянка даної кривої описується рівнянням:

$$c = \frac{z - 6,8091}{2,2683},$$

де c – це концентрація L-аргініну в комірці (в мкМ), а z – відгук біосенсора на дану концентрацію (в мкСм).

Чутливість до L-аргініну для даного біосенсора становила 1927 мкСм/мМ. Шум та дрейф базової лінії для даного вимірювання становили 1,6 мкСм/хв та 0,72 мкСм/хв відповідно.

Відповідно до отриманих результатів, розроблений біосенсор є перспективним до застосування для подальшого кількісного аналізу L-аргініну в реальних фармацевтичних зразках.

ВИСНОВКИ

В роботі було розроблено кондуктометричний аргінін-чутливий біосенсор на основі аргініндеімінази для кількісного визначення аргініну у фармацевтичних зразках. Проведено

оптимізацію умов іммобілізації ферменту на поверхні кондуктометричного перетворювача: спосіб іммобілізації – в парах глутарового альдегіду; концентрація ферменту в біоселективній мембрані – 88,2 од.акт/мл; тривалість іммобілізації – 30 хв. Визначено вплив основних параметрів розчину (іонної сили, буферної ємності, рН, температура та концентрації білка) на величину відгуків біосенсора на L-аргінін. Оптимальним буферним розчином для роботи аргінін-чутливого біосенсора був 5 мМ фосфатний буфер за рН 6,2.

Також в роботі була перевірена селективність біосенсора стосовно можливих інтерферуючих речовин. На жаль, біосенсор характеризувався незначною чутливістю до аспаргінової та глутамінової кислоти (реакція біосенсора – 20%) та сильною чутливістю до аскорбінової та лимонної кислот. Величини відгуків на інші речовини були мінімальними або не перевищували 20%.

Показано, що біосенсор характеризується високою відтворюваністю результатів впродовж одного дня активної роботи (RSD= 6,1% для 1,5 мМ субстрату), а також характеризується високою операційною стабільністю протягом двох тижнів. Було визначено найкращі умови довгострокового зберігання, а саме – в сухому стані за температурі –18 °С.

Після розробки біосенсора і оптимізації його роботи було досліджено основні аналітичні характеристики: чутливість, динамічний та лінійний діапазон роботи, мінімальна межа визначення, шум та дрейф базової лінії тощо. За результатами досліджень встановлено, що розроблений біосенсор можна з успіхом використовувати для кількісного визначення L-аргініну для контролю процесу виробництва діабетичних добавок, що містять L-аргініну.

Беркета Ксенія Олександрівна, ksenya.berketa.10@gmail.com

Саяпіна Ольга Ярославівна

Фаюра Любов Романівна

Сибірний Андрій Андрійович

Дзядевич Сергій Вікторович

Солдаткін Олександр Олексійович

ПОДЯКИ

Робота профінансована за рахунок гранту НАН України для науково-дослідних лабораторій/груп молодих вчених НАН України для проведення досліджень у межах пріоритетних напрямів розвитку науки і техніки. Частина досліджень було проведено завдяки фінансовій підтримці 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]. P. Lucotti, L. Monti, E. Setola et al. Oral L-arginine supplementation improves endothelial function and ameliorates insulin sensitivity and inflammation in cardiopathic nondiabetic patients after an aortocoronary bypass. *Metabolism*, 58(9), pp. 1270–1276 (2009).
- [2]. C. Baylis. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*, 294, 1–9 (2008).
- [3]. F. Facchinetti, G. R. Saade, I. Neri et al. L-arginine supplementation in patients with gestational hypertension: a pilot study. *Hypertens. Pregnancy*, 26(1), 121–130 (2007).
- [4]. R. I. Yatsyshyn, M. Ya. Sukhorebska. Improving efficiency of treatment of patients suffering from osteoarthritis with co-existent abdominal obesity secondary to dyslipidemia. *Galician Medical Journal*, 22(1), 92–96 (2015).
- [5]. J. George, S. B. Shmuel, A. Roth et al. L-arginine attenuates lymphocyte activation and anti-oxidized LDL antibody levels in patients undergoing angioplasty. *Atherosclerosis*, 174(2), 323–327 (2014).
- [6]. F. Moutaouakil, H. El Otmani, H. Fadel et al. L-arginine efficiency in MELAS syndrome. A case report. *Rev. Neurol. (Paris)*, 165(5), 482–485 (2009).
- [7]. R. K. Oka, A. Szuba, J. C. Giacomini, J. P. Cooke. A pilot study of L-arginine supplementation on functional capacity in peripheral arterial disease. *Vasc. Med.*, 10(4), 265–274 (2005).
- [8]. Y. Ozsoy, M. Ozsoy, T. Coskun, K. Namli, A. Var, B. Ozyurt. The effects of L-arginine on liver damage in experimental acute cholestasis an immunohistochemical study. *HPB Surgery*, Article ID306069 (2011).
- [9]. J. K. Yoon, A. Frankel, L. G. Feun, S. Ekmekcioglu, K. B. Kim. Arginine deprivation therapy for malignant melanoma. *Clinical pharmacology: advances and applications*, 5(1), 11–19 (2013).
- [10]. M. M. Seliuk, M. M. Kozachok, I. M. Lyovkin, O. V. Seliuk. Optimal combinations of metabolic drugs for the treatment of cardiovascular disorders. *Family Medicine*, 2(70), 60–64 (2017).
- [11]. L. Voloshyna, L. Vlasyk, O. Voloshyn. Dietary supplements or parapharmaceuticals: products with high content of arginine in rehabilitation treatment in patients with osteoarthritis with high comorbidity level. *Problems of Nutrition*, 1, 31–39 (2017).
- [12]. S. Sakaguchi. A new color reaction of protein and arginine. *J. Biochem.*, 5, 25–31 (1925).
- [13]. C. J. Weber. A modification in Sakaguchi's reaction for the quantitative determination of arginine. *J. Biol. Chem.*, 86, 217–222 (1930).

- [14]. S. Sakaguchi. A new method for the colorimetric determination of arginine. *J. Biochem.*, 37(2), 231–236 (1950).
- [15]. Y. R. Tahboub, H. L. Pardue. A predictive-kinetic method for the quantitation of amino acids with ninhydrin. *Anal. Chim. Acta*, 173, 23–32 (1985).
- [16]. H. A. Medien. Spectrophotometric method for determination and kinetics of amino acids through their reaction with syringaldehyde. *Spectrochim. Acta A*, 54, 359–365 (1998).
- [17]. M. I. Parniak, G. Lange, T. Viswanatha. Quantitative determination of monosubstituted guanidines: a comparative study of different procedures. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 7(4), 267–276 (1983).
- [18]. M. E. Gange, P. S. Francis, J. W. Costin, N. W. Barnett, S. W. Lewis. Determination of arginine in dietary supplements. *J. Sci. Food Agric.*, 85, 1217–1221 (2005).
- [19]. J. Csapó, Cs. Albert, K. Lóki, Zs. Csapó-Kiss. Separation and determination of the amino acids by ion exchange column chromatography applying post column derivatization. *Acta Univ. Sapientiae Alimentaria*, 1, 5–29 (2008).
- [20]. V. Gopalakrishnan, P. J. Burton, T. F. Blaschke. High-performance liquid chromatographic assay for the quantitation of L-arginine in human plasma. *Anal. Chem.*, 68(19), 3520–3523 (1996).
- [21]. S. Zinellu, L. Sotgia, C. Carru Deiana. Quantification of arginine and dimethylated arginines in human plasma by field-amplified sample injection capillary electrophoresis UV detection. *Methods Mol. Biol.*, 984, 131–138 (2013).
- [22]. J. Martens-Lobenhoffer, S. M. Bode-Böger. Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography–mass spectrometry with very straightforward sample preparation. *J. Chromatogr. B*, 798(2), 231–239 (2003).
- [23]. R. M. de Ordunã. Quantitative determination of L-arginine by enzymatic end-point analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 549–552 (2001).
- [24]. M. Kameya, Y. Asano. Rapid enzymatic assays for L-citrulline and L-arginine based on the platform of pyrophosphate detection. *Enzyme Microbial Technol.*, 57, 36–41 (2014).
- [25]. N. Ye. Stasyuk, G. Z. Gayda, L. R. Fayura, Y. R. Boretsky, M. V. Gonchar, A. A. Sibirny. Novel arginine deiminase-based method to assay L-arginine in beverages. *Food Chem.*, 201, 320–326 (2016).
- [26]. N. Stasyuk, G. Gayda, H. Yepremyan, A. Stepien, M. Gonchar. Fluorometric enzymatic assay of L-arginine. *Spectrochim. Acta A*, 170, 184–190 (2017).
- [27]. N. Verma, A. K. Singh, M. Singh. L-arginine biosensors: A comprehensive review. *Biochem. Biophysics Reports*, 12, 228–239 (2017).
- [28]. S. Dzyadevych, N. Jaffrezic-Renault. Conductometric biosensors. *Biological Identification*, 153–193 (2014).
- [29]. O. Saiapina, S. Dzyadevych, Sergei, N. Jaffrezic-Renault, A. Soldatkin. Development and optimization of a novel conductometric bi-enzyme biosensor for L-arginine determination. *Talanta*, 92, 58–64 (2012).
- [30]. S. Misawa, M. Aoshima, H. Takaku, M. Matsumoto, H. Hayashi. High-level expression of Mycoplasma arginine deiminase in Escherichia coli and its efficient renaturation as an anti-tumor enzyme. *Biotechnol.* 36, 145–155 (1994).
- [31]. O. Y. Saiapina, V. M. Pyeshkova, O. O. Soldatkin. Conductometric enzyme biosensors based on natural zeolite clinoptilolite for urea determination. *Materials Science and Engineering: Vol. 31. № 7*, 1490–1497 (2011).
- [32]. L. R. Fayura, Y. R. Boretsky, Y. U. Pynyaha, D. N. Wheatley, A. A. Sibirny. Improved method for expression and isolation of the Mycoplasma hominis arginine deiminase from the recombinant strain of Escherichia coli. *J. Biotechnol.* 167(4), 420–6 (2013).
- [33]. F. W. Studier, B. A. Moffatt. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189(1), 113–130 (1986).

Стаття надійшла до редакції 05.01.2023 р.

UDC 543.06:577.15:543.553

DOI: 10.18524/1815-7459.2023.1.275947

DEVELOPMENT OF CONDUCTOMETRIC ARGININE-SENSITIVE BIOSENSOR BASED ON ARGININE DEIMINASE

K. O. Berketa^a, O. Y. Saiapina^a, L. R. Fayura^b, A. A. Sibirny^{b,c}, S. V. Dzyadevych^a, O. O. Soldatkin^a

^a Laboratory of Biomolecular Electronics, Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, 150 Zabolotnogo Str., 03680, Kyiv, Ukraine

^b Institute of Cell Biology, National Academy of Science of Ukraine, 14/16 Drahomanov Str., 79005, Lviv, Ukraine

^c Rzeszow University, Zelwerowicza 4, 35–601 Rzeszow, Poland
ksenya.berketa.10@gmail.com; osayapina4@gmail.com; fayural@gmail.com;
sibirny@yahoo.com; dzyad@yahoo.com; soldatkinsasha@gmail.com

Summary

Arginine is a conditionally irreplaceable amino acid, an active cellular regulator of a number of vital processes. To regulate the level of arginine in the body, bio-additives are used, so there is a need for reliable, fast and affordable quality control methods. Currently, there is a wide range of methods for the quantitative determination of arginine. The methods are effective in application, but have a number of disadvantages: high cost, long pre-treatment of samples, complexity of analysis. To solve these problems, we created a single-enzyme conductometric biosensor based on arginine deiminase for the selective determination of arginine in pharmaceutical samples.

During the research, we selected the optimal method and parameters of enzyme immobilization on the surface of the conductometric transducer; checked the influence of the main parameters of the solution on the functioning of the proposed biosensor based on arginine deiminase, such as the ionic strength of the solution, buffer capacity, pH, temperature, protein concentration in the solution, etc.; conducted a study of the stability of the developed biosensor during use and storage, its selectivity. The last stage was the determination of its analytical characteristics.

Thus, the optimal conditions for immobilization on the surface of the transducer are determined to be immobilization in glutaraldehyde vapors for 30 minutes, while the concentration of the enzyme in the membrane is 88.2 U/ml. The optimal buffer solution for the operation of an arginine-sensitive biosensor is 5 mM phosphate buffer with a pH of 6.2. When checking the selectivity to possible interferences, it was determined that the biosensor is characterized by a slight sensitivity to aspartic and glutamic acids (the reaction of the biosensor is 20%) and a strong sensitivity to ascorbic and citric acids. It is shown that the biosensor is characterized by high reproducibility of results during one day of active operation (RSD= 6,1% for 1.5 mM substrate), as well as good operational stability during two weeks. The best conditions for long-term storage were determined, namely, in a dry state at a temperature of –18 °C. Analytical characteristics of the biosensor developed in the work were analyzed. It was established that the minimum limit of determination of arginine is 2 μM. The linear range is from 20 to 750 μM L-arginine. The sensitivity to L-arginine is 1927 μS/mm. Baseline noise and drift are 1.6 μS/min and 0.72 μS/min, respectively.

Therefore, the developed biosensor can be successfully used for the quantitative determination of L-arginine to control the production process of diabetic supplements containing L-arginine.

Keywords: L-arginine, biosensor, conductometric transducer, arginine deiminase, enzyme immobilization

УДК 543.06:577.15:543.553

DOI: 10.18524/1815-7459.2023.1.275947

РОЗРОБКА КОНДУКТОМЕТРИЧНОГО АРГІНІН-ЧУТЛИВОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ АРГІНІНДЕІМІНАЗИ

*К. О. Беркета¹, О. Я. Саяпіна¹, Л. Р. Фаюра², А. А. Сибірний^{2,3},
С. В. Дзядевич¹, О. О. Солдаткін¹*

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

² Інститут біології клітини НАН України
79005, вул. Драгоманова 14/16 м. Львів, Україна.

³ Жешувський університет,
вул. Зельверовича 4, 35–601, м. Жешув, Польща.

ksenya.berketa.10@gmail.com; osayapina4@gmail.com; fayural@gmail.com;
sibirny@yahoo.com; dzyad@yahoo.com; soldatkinsasha@gmail.com

Реферат

Аргінін – умовно незамінна амінокислота, активний клітинний регулятор ряду життєво-важливих процесів. Для регуляції рівня аргініну в організмі використовують біологічно активні добавки та фармацевтичні препарати, тому існує потреба в надійних, швидких і доступних методах контролю їх якості. Наразі існує широкий спектр методів кількісного визначення аргініну. Вони ефективні у застосуванні, але мають ряд недоліків: високу вартість, тривалу попередню обробку проб, складність аналізу. Для вирішення цих проблем ми створили одноферментний кондуктометричний біосенсор на основі аргініндеїмінази для селективного визначення аргініну у фармацевтичних зразках.

В ході дослідження ми підібрали оптимальні метод і параметри іммобілізації ферменту на поверхні кондуктометричного перетворювача; перевірили вплив основних параметрів розчину на функціонування запропонованого біосенсора на основі аргініндеїмінази, таких як іонна сила розчину, буферна ємність, рН, температура, концентрація білку в розчині, тощо; провели дослідження стабільності розробленого біосенсора при використанні та зберіганні, його селективності. Останнім етапом було визначення його аналітичних характеристик.

Так, оптимальними умовами іммобілізації на поверхні перетворювача визначено іммобілізацію в парах глутарового альдегіду протягом 30 хвилин, при цьому концентрація ферменту в мембрані дорівнює 88,2 од.акт./мл. Оптимальний буферний розчин для роботи аргінін-чутливого біосенсора – 5 мМ фосфатний буфер з рН 6,2. При перевірці селективності стосовно можливих інтерферентів визначено, що біосенсор характеризується незначною чутливістю до аспаргінової та глутамінової кислоти (реакція біосенсора – 20%) та сильною чутливістю до аскорбінової та лимонної кислот. Показано, що біосенсор характеризується високою відтворюваністю результатів впродовж одного дня активної роботи (RSD= 6,1% для 1,5 мМ субстрату), а також гарною операційною стабільністю протягом двох тижнів. З'ясовано найкращі умови довгострокового зберігання, а саме – в сухому стані при температурі –18 °С. Проаналізовано аналітичні характеристики розробленого в роботі біосенсора. Встановлено, що мінімальна межа визначення аргініну – 2 мкМ. Лінійний діапазон знаходиться в межах від 20 до 750 мкМ

L-аргініну. Чутливість до L-аргініну становить 1927 мкСм/мМ. Базовий шум і дрейф становлять 1,6 мкСм/хв і 0,72 мкСм/хв відповідно.

Отже, розроблений біосенсор можна з успіхом використовувати для кількісного визначення L-аргініну для контролю фальсифікації або процесу виробництва діабетичних добавок, що містять L-аргінін.

Ключові слова: біосенсор, кондуктометричний перетворювач, аргініндеіміназа, аналіз L-аргініну, іммобілізація ферменту