

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

PACS 543.555+577.15+543.06

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2024.2.307066>

ПОКРАЩЕННЯ АНАЛІТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ БІОСЕНСОРІВ НА ОСНОВІ ФЕРМЕНТІВ КЛАСУ ОКСИДАЗ ЗА ДОПОМОГОЮ ДОДАВАННЯ У БІОСЕЛЕКТИВНУ МЕМБРАНУ ДОПОМІЖНОГО ФЕРМЕНТУ – КАТАЛАЗИ

Беркета Ксенія^{1,2}, Дзядевич Сергій^{1,2}, Солдаткін Олександр¹

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ,
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 60, Київ, Україна, 01033
E-mail: ksenya.berketa.10@gmail.com

ПОКРАЩЕННЯ АНАЛІТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ БІОСЕНСОРІВ НА ОСНОВІ ФЕРМЕНТІВ КЛАСУ ОКСИДАЗ ЗА ДОПОМОГОЮ ДОДАВАННЯ У БІОСЕЛЕКТИВНУ МЕМБРАНУ ДОПОМІЖНОГО ФЕРМЕНТУ – КАТАЛАЗИ

Беркета Ксенія, Дзядевич Сергій, Солдаткін Олександр

Анотація. Запропоновано методику покращення аналітичних характеристик біосенсора на основі оксидаз, за якою в його біоселективну мембрану додається допоміжний фермент каталаза. В даному випадку каталаза використовується для збільшення насичення біомембрани киснем, і, відповідно, полегшення проходження реакції, що каталізується ферментами класу оксидаз. В роботі порівняно стандартний моноферментний кондуктометричний біосенсор на основі глюкозооксидази для визначення глюкози та новий – біферментний біосенсор на основі глюкозооксидази та каталази. Досліджено оптимальний метод коїмобілізації ферментів на поверхні кондуктометричного перетворювача, а також залежність роботи біосенсора від концентрації каталази в біоселективній мембрані. Перевірено стабільність процедури приготування біосенсора та відтворюваність його результатів. Порівняно аналітичні характеристики запропонованого біферментного біосенсора з моноферментним біосенсором.

Показано що додавання каталази до біоселективного елементу біосенсора в якості допоміжного ферменту суттєво покращує аналітичні характеристики біосенсора, в тому числі чутливість, відтворюваність результатів вимірювання і лінійний та динамічний діапазони роботи. Розроблений метод може бути в подальшому використаний для покращення параметрів інших біосенсорів на основі оксидаз.

Ключові слова: аналітичні методи, біферментний біосенсор, каталаза, кондуктометричний перетворювач, оксидоредуктази, аналітичні характеристики біосенсора

IMPROVEMENT OF THE ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF OXIDASE-BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS BY ADDING AN ADDITIONAL ENZYME – CATALASE TO THE BIOSELECTIVE MEMBRANE

Kseniia Berketa, Sergiy Dzyadevych, Oleksandr Soldatkin

Abstract. In this study, the additional enzyme catalase is added to the bioselective membrane of the monoenzyme biosensor to improve the analytical characteristics of the biosensor. In this case, catalase is used to increase the saturate the biomembrane with oxygen, and, accordingly, facilitate the passage of the reaction catalyzed by enzymes of the oxidase class. A standard monoenzyme conductometric biosensor based on glucose oxidase for glucose determination and a new bi-enzyme biosensor based on glucose oxidase and catalase were compared. The optimal method of coimmobilization of enzymes on the surface of the conductometric transducer was investigated, as well as the dependence of the biosensor performance on the concentration of catalase in the bioselective membrane. The stability of the biosensor preparation procedure and the reproducibility of its results were verified. The analytical characteristics of the proposed bi-enzyme biosensor are compared with the monoenzyme biosensor.

It is shown that the addition of catalase to the bioselective element of the biosensor as an additional enzyme significantly improves the analytical characteristics of the biosensor, including sensitivity, reproducibility of measurement results, and linear and dynamic ranges of operation. The developed method could be used in future to improve the parameters of other oxidase-based biosensors.

Keywords: analytical methods, bi-enzyme biosensor, catalase, conductometric transducer, oxidoreductases, biosensor analytical characteristics

Вступ

В сучасному світі особливу увагу приділяють розробці нових методів точного та селективного аналізу різних речовин. Можливості застосування даних методів дуже різноманітні – від медичної діагностики різних хвороб та моніторингу навколишнього середовища до контролю якості продуктів харчування [1–5]. Наразі існує велике різноманіття традиційних методик якісного та кількісного аналізу – хімічні методи, імунологічний аналіз та хроматографія, спектрофотометрія, флуоресцентне та люмінесцентне визначення, ферментні методи аналізу тощо. Однак останнім часом широкого розповсюдження набувають біосенсорні методи. Активний розвиток даного напрямку досліджень викликаний тим, що згадані раніше традиційні методики вимірювання часто не відрізняються високою точністю аналізу, потребують громіздкого обладнання, що відрізняється високою вартістю та складністю роботи, тривалим часом аналізу та необхідністю комплексного процесу підготовки зразків до вимірювання. Деякі традиційні методи є

недостатньо чутливими та можуть мати значні похибки при вимірюванні низьких концентрацій аналіту, можуть відрізнятися низькою селективністю відносно інтерферуючих речовин.

У порівнянні з традиційними методами, електрохімічні біосенсори характеризуються невисокою вартістю аналізу та простотою виготовлення, відзначаються портативністю, швидкістю аналізу, що дозволяє проводити вимірювання в режимі реального часу. Іншою суттєвою перевагою є те, що біосенсори є високоселективними відносно можливих інтерферентів [7,8]. Біосенсори, зазвичай, використовують біологічні реакції перетворення для визначення концентрації аналіту, що дозволяє досягти високої точності та достовірності результатів.

Ферментні біосенсори є одними з найбільш розповсюджених серед електрохімічних біосенсорів через їхню високу селективність та швидкість аналізу. Звісно, існує ряд проблем, що можуть виникнути при розробці ферментних біосенсорних систем, зокрема, короткий лінійний діапазон визначення аналіту

або недостатня мінімальна границя його визначення. Як наслідок – покращення аналітичних характеристик ферментних біосенсорів є одним з головних завдань при їх розробці.

Наразі існує багато методів покращення аналітичних характеристик ферментних біосенсорів. Наприклад, вдосконалення перетворювачів та вимірювальних приладів призводить до підвищення їхньої роздільної здатності, стабільності сигналу та мінімізації шумів. Також можуть бути використані мікро- та міліфлюїдні системи або наноматеріали, що може суттєво покращити чутливість та точність результатів вимірювання та розширити лінійний діапазон роботи біосенсора [9–18]. Крім того, існує багато сучасних методик поліпшення процедури іммобілізації та/або оптимізації складу біоселективних елементів [19–20].

Іншим успішним підходом покращення параметрів біосенсорів є використання декількох ферментів в складі біоселективних елементів. Зазвичай цей підхід застосовують з метою або покращення селективності за рахунок розщеплення інтерферентів додатковим ферментом, або підвищення чутливості за рахунок перетворення продуктів базової ферментативної реакції назад у субстрат з використанням додаткового ферменту. Тож створення мультиферментних біоселективних елементів може бути корисним для покращення аналітичних характеристик вже існуючих біосенсорів, наприклад, через покращення їхньої чутливості або розширення лінійного діапазону роботи біосенсора за рахунок додаткових ферментативних реакцій [21, 22].

Мультиферментні системи, на основі незалежних ферментних реакцій складаються з двох (або більше) ензимів. Один з них є «головним» – що каталізує реакцію перетворення аналіту в електроактивний продукт. Інші ферменти є «допоміжними» – вони продукують додаткові субстрати головного ферменту, що покращують робочі характеристики та підсилюють реакцію біосенсора на цільовий аналіт.

Біферментний біосенсор, що розроблений в даному дослідженні, має в основі своєї роботи кілька незалежних ферментативних реакцій, що каталізуються каталазою (КАТ)

та глюкозооксидазою (ГОД). ГОД виступає в якості головного ферменту, що каталізує реакцію окиснення D-глюкози з утворенням пероксиду водню та D-глюконо-1,5-лактону, що спонтанно перетворюється до глюконової кислоти, що дисоціює на протон та кислотний залишок. Зміна іонного складу розчину спричиняє зміну провідності в приелектродному просторі біосенсора, яка фіксується кондуктометричним перетворювачем. Пероксид водню, що утворюється в ході головної реакції, в присутності каталази розкладається до води та кисню, який, в свою чергу, насичує ферментну мембрану, зменшуючи лімітування роботи ГОД через нестачу O_2 . За рахунок насичення ферментної мембрани киснем і досягаються основні ефекти по розширенню діапазону визначення глюкози та зменшення її мінімальної границі визначення.

Матеріали та методи

Матеріали

Для створення біосенсора були використані ферменти каталаза (КАТ) з бичачої печінки з активністю $\geq 10\,000$ од.акт./мл (Sigma-Aldrich, США) та глюкозооксидаза (ГОД) з *Aspergillus niger* з активністю 100–250 од.акт./мл (Sigma-Aldrich, Великобританія). Бичачий сироватковий альбумін (V фракція) (БСА) та 25% водного розчину глутарового альдегіду (ГА), гліцерол та КСІ були отримані від Sigma-Aldrich (США). Як субстрат було використано стоковий розчин D-глюкози із концентрацією 500 мМ (Sigma-Aldrich, США). Для приготування буферного розчину був використаний KH_2PO_4 (Sigma-Aldrich, США). Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“.

Для виготовлення мембран були використані наступні гелі:

– Гель на основі ГОД, що включав 20% глюкозооксидази, 5% БСА та 10% гліцеролу в 30 мМ фосфатному буферному розчині з рН 6,2.

– Гель на основі КАТ, що включав 15% каталази, 5% БСА та 10% гліцеролу в 30 мМ фосфатному буфері з рН 6,2.

– Білковий гель на основі БСА, що включав 10% БСА та 20% гліцеролу в 30 мМ фосфатному буфері з рН 6,2.

Кондуктометричні перетворювачі

Кондуктометричні перетворювачі, що були використані в роботі мають розміри 30x5 мм та складаються з двох ідентичних пар золотих гребінчастих електродів, нанесених на ситалову підкладку (рис. 1). Кожна пара електродів складається із 20 паралельних

растрових пальців, з їхньою шириною та відстанню між ними в 20 мкм. Загальна площа чутливої поверхні електрода становить 1,5 мм². Більше детально схема роботи перетворювачів описана в роботі [23].

Використання системи з двох пар електродів дозволяє виконувати вимірювання в диференційному режимі: одна з пар електродів (референтна) з мембраною на основі бичачого сироваткового альбуміну вимірює загальну

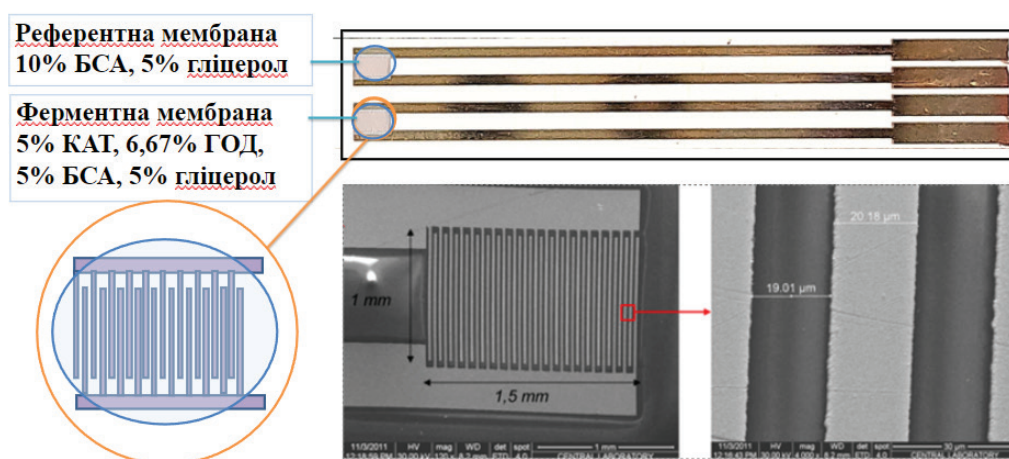


Рис. 1. Схема кондуктометричного перетворювача.

провідність розчину, в той час як друга, чутлива, з біоселективним елементом на основі суміші ферментних гелів, вимірює не тільки загальну провідність розчину, а й специфічний сигнал, що виникає внаслідок ензиматичних реакцій в мембрані на поверхні перетворювача. Використання диференційного режиму вимірювань дозволяє суттєво зменшити вплив неінформативних параметрів (температура, зміна загальної провідності розчину, освітлення та ін.) на результати вимірювань.

Портативний пристрій для кондуктометричних вимірювань

Кондуктометричний портативний вимірювальний прилад був розроблений з урахуванням наших рекомендацій та люб'язно наданий нам Інститутом електродинаміки НАН України.

В основі роботи приладу лежить вдосконалена диференційна вимірювальна схема кондуктометричної системи з автоматичним

балансуванням та діагностикою параметрів сенсора, що була детально описана в роботах [24, 25]. Робоча синусоїдальна напруга, що використовується в системі, становить 14 мВ, а її частота – 66 кГц. Прилад має спеціальне програмне забезпечення, що розроблене для його використання в біосенсоріці для реєстрації результатів кондуктометричних вимірювань. Даний пристрій дозволяє нівелювати фарадєвські процеси та ефекти поляризації мікроелектродів. Також, за рахунок використання диференційного режиму вимірювань можна скоротити до мінімуму вплив освітлення та температури на сигнали біосенсора.

Приготування біоселективних елементів

Моноферментний біоселективний елемент на основі ГОД

Біоселективну та референтну мембрани на поверхню кондуктометричних перетворювачів наносили мікродозаторами за наступ-

ною методикою. На першу пару електродів було нанесено 100 нл гелю з ГОД, на другу (референтну) пару наносили 100 нл гелю на основі лише БСА. Імобілізацію проводили в парах глутарового альдегіду, розміщуючи перетворювачі з нанесеними мембранами в ексікатор на 20 хвилин. Після імобілізації, мембрани біосенсора підсушували на повітрі впродовж 10 хвилин, після чого відмивали робочим буферним розчином від залишків незв'язаного глутарового альдегіду та інших компонентів мембрани впродовж 5 хвилин, кілька разів змінюючи буферний розчин. За рахунок імобілізації білків в парах глутарового альдегіду, створювалась тривимірна сітка ферменту в матриці БСА, що була скріплена за рахунок ковалентного зшивання глутаровим альдегідом.

Біферментний біоселективний елемент на основі ГОД та КАТ

Два ферментних гелі були використані для створення біферментного біоселективного елементу – на основі ГОД та КАТ. Вони були змішані у співвідношенні 2:1, після чого 100 нл суміші було нанесено на одну пару електродів. Нанесення референтної мембрани

та сам процес імобілізації були виконані ідентично тому, як описано вище.

Методика біосенсорних вимірювань

Вимірювання проводились у відкритій вимірювальній комірці об'ємом 2 мл. Як буферний розчин було використано 5 мМ фосфатний буфер з рН 6,2. Для досягнення необхідної концентрації аналіту до вимірювальної комірки додавали аліквоти стокового розчину D-глюкози з концентрацією 500 мМ. Неспецифічні зміни сигналу, викликані змінами температури, рівня освітлення, рН, сили струму та інших неінформативних чинників були виключені за рахунок використання диференційного режиму вимірювань. Тривалість отримання одного відгуку становила приблизно 2–3 хвилини, між відгукми біосенсор промивали впродовж 2-х хвилин, кілька разів змінюючи буферний розчин.

Відгук біосенсора на додавання у вимірювальну комірку аналіту може бути розрахований двома методами: в першому випадку вимірюється різниця провідності (dS) між базовими лініями до та після отримання відгуку на цільову молекулу, в другому – швидкість зміни провідності ($V_0 = \frac{dS}{dt}$) відносно стандартних відгуків (рис. 2).

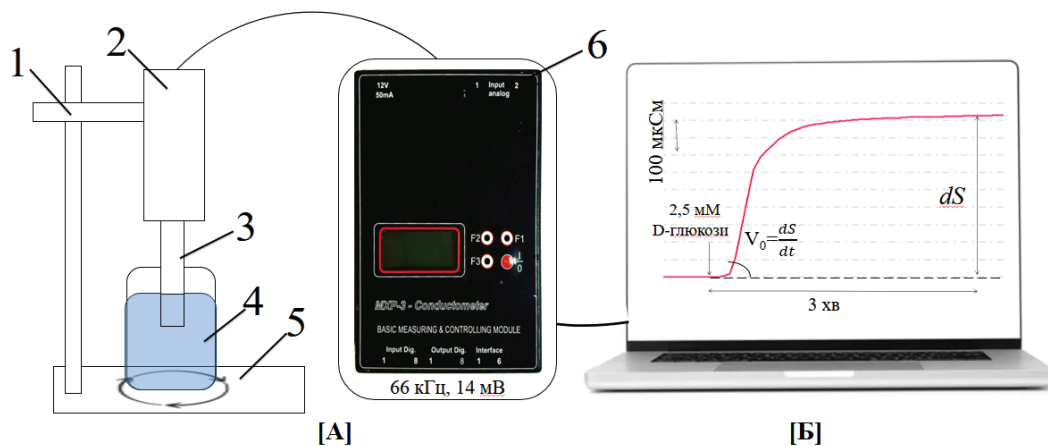


Рис. 2. Схема роботи портативного приладу для кондуктометричних вимірювань.

А – схематичне зображення устаткування для вимірювань: 1 – тримач, 2 – контактний пристрій, 3 – кондуктометричний перетворювач, 4 – вимірювальна комірка, наповнена буферним розчином, 5 – магнітна мішалка, 6 – портативний прилад для кондуктометричних вимірювань.

Б – типовий відгук біосенсора на додавання 2,5 мМ D-глюкози у вимірювальну комірку (вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері з рН 6,2).

Всі розрахунки, аналіз результатів, статистика та побудова графіків проводились в програмі OriginLab OriginPro 8,5.

Результати та обговорення

Принцип функціонування моно- та біферментних біосенсорів

В основі функціонування моноферментного біосенсора для вимірювання концентрації глюкози лежить ензиматична реакція за участі ГОД. Глюкозооксидаза – це фермент класу оксидоредуктаз, що каталізує реакцію окиснення D-глюкози до глюконо-1,5-лактону (реакція 1 – рис. 3), що в подальшому спон-

танно перетворюється до глюконової кислоти, яка в свою чергу, дисоціює з утворенням протону та аніону глюконової кислоти (реакція 3 – рис. 3), що призводить до зміни електропровідності всередині моноферментної мембрани біосенсора. Ця зміна фіксується портативним кондуктометричним вимірювальним приладом за допомогою кондуктометричного перетворювача.

Для покращення аналітичних характеристик моноферментного біосенсора на основі ГОД, було вирішено додати до біоселективної мембрани каталазу в якості допоміжного ферменту. КАТ також є ферментом класу

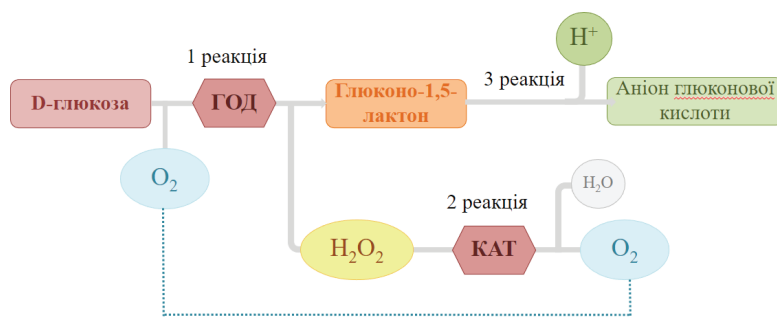


Рисунок 3. Схематичний вигляд реакцій, що лежать в основі роботи моно- та біферментного біосенсорів.

Реакція 1 – окиснення бета-D-глюкози у присутності ГОД.

Реакція 2 – розпад пероксиду водню під дією каталази.

Реакція 3 – гідролітична дисоціація глюконо-1,5-лактону (продукт реакції 1) з утворенням електроактивних сполук, що змінюють провідність у біоселективному елементі біосенсора.

оксидоредуктаз, який каталізує розкладання пероксиду водню на воду і кисень (реакція 2 – рис. 3). В результаті цієї реакції концентрація кисню всередині мембрани в приелектродному просторі перетворювача відновлюється, відповідно зникають обмеження роботи глюкозооксидази внаслідок нестачі кисню, що призводить до поліпшення аналітичних характеристик біосенсора.

Підбір методу ко-імобілізації КАТ і ГОД

Важливим етапом розробки мультиферментних біосенсорів є вибір методу ко-імобілізації двох ферментів на поверхні перетворювача. Для перевірки ми обрали такі варіанти приготування біосенсорів:

1) Одношарова мембрана на основі суміші двох ферментів. У цьому випадку ферменти змішували у співвідношенні 1:2 (ферментний гель КАТ: ферментний гель ГОД) перед нанесенням на поверхню перетворювача; 2) Двошарова мембрана, утворена двома гелями ферментів, які іммобілізуються на поверхні перетворювача в два етапи. Нижній шар – ферментний гель на основі КАТ, верхній шар – ферментний гель на основі ГОД; 3) Двошарова мембрана, нижній шар – ферментний гель на основі ГОД, верхній – ферментний гель на основі КАТ; 4) Одношарова мембрана на основі одного ферменту – ферментний гель ГОД. До робочого буферного розчину додавали нативну КАТ; 5) Одношарова мембрана на основі

одного ферменту – ферментний гель ГОД, без додавання в систему інших ферментів.

Відповідно, було створено ряд біосенсорів з описаними вище варіантами приготування біоселективних елементів (1–5). Калібрувальні криві визначення глюкози для всіх варіантів наведено на рис. 4.

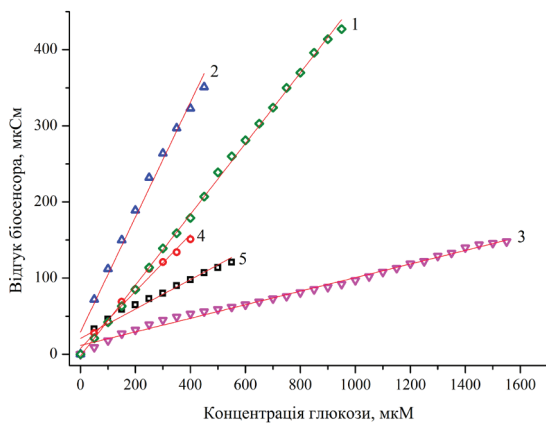


Рис. 4. Лінійні діапазони калібрувальних кривих біосенсорів на основі різних методів коїмобілізації ферментів в складі біоселективного елементу (варіанти 1–5). Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері з рН 6,2.

З рисунку видно, що біосенсори, створені за варіантами приготування 2, 4 та 5 (двошарова мембрана з нижнім шаром КАТ, моноферментна мембрана ГОД з додаванням нативної КАТ до розчину та моноферментна мембрана ГОД, відповідно) характеризувалися досить вузькими лінійними діапазонами роботи. Порівняно з ними біосенсори, створені за варіантами підготовки 1 і 3 (двоферментна одношарова мембрана і двошарова біомембрана з нижнім шаром на основі ГОД), мають більш широкий діапазон роботи. Лінійний діапазон біосенсора варіанту 3 розширюється приблизно в 3–3,5 рази порівняно з біосенсором варіанту 5, що, ймовірно, пов'язано з довшим часом, протягом якого субстрат надходить від буфера до активного центру ГОД, оскільки дифузія ускладнюється наявністю верхньої мембрани на основі КАТ. Порівняно з цим, біосенсор на основі мембрани з сумішшю ферментів (варіант 1) мав діапазон приблизно в 1,5 рази більший, ніж у моноферментного біосен-

сора (варіант 5), що було викликано ефектом каталази на проходження основної ферментативної реакції.

Чутливість біосенсорів на основі всіх 5 варіантів приготування також відрізнялася – найбільш чутливим виявився біосенсор на основі 1 варіанту. І, враховуючи те, що він має широкий лінійний діапазон визначення глюкози, варіант 1 біосенсора було обрано як найбільш оптимальний. Відповідно, для створення біосенсорів у подальших експериментах був використаний метод коїмобілізації каталази та глюкозооксидази в одношаровій мембрані на поверхні кондуктометричного перетворювача.

Підбір оптимальної концентрації ферментів в біоселективній мембрані біосенсора

Наступним важливим етапом розробки мультиферментних біосенсорів є підбір оптимальної концентрації ферментів у біоселективній мембрані. Концентрація ГОД (10%) у мембрані була обрана за результатами досліджень, отриманих у попередніх роботах [26,27,28]. Тому було досліджено вплив концентрації каталази в біоселективній мембрані на відгук біосенсора. Величину відгуків на додавання у вимірювальну комірку 2,5 мМ глюкози порівнювали для низки біосенсорів на основі різної кількості КАТ у мембрані. Концентрація глюкози була обрана такою, щоб відповідати абсолютному насиченню фермента субстратом та косубстратом (кисень), коли кожна молекула іммобілізованого ферменту задіяна у перетворенні молекул субстрату (рис. 5).

Результати, приведені на рис. 5 доводять, що найвища чутливість біосенсора до глюкози спостерігалася при використанні ферментного гелю з 5% КАТ. Біферментний біосенсор характеризувався аналогічною чутливістю при концентрації 7,5% КАТ у гелі. Однак, за такого варіанту, зростала середньоквадратична похибка вимірювань, тому оптимальною концентрацією КАТ було обрано 5%.

Додатково, в рамках експерименту по підборі оптимальної концентрації КАТ було досліджено як змінюється лінійний діапазон

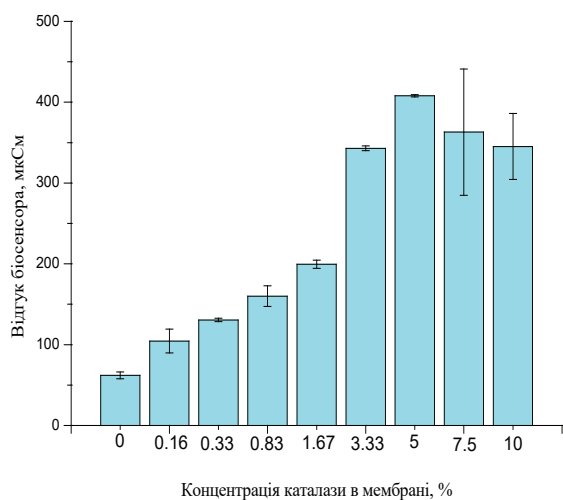


Рис. 5. Залежність відгуку біферментного біосенсора від концентрації каталази в біоселективній мембрані. Концентрація глюкози 2,5 мМ. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері з рН 6,2.

роботи біосенсора при різних концентраціях КАТ в біоселективній мембрані біферментного біосенсора. Для вивчення даного параметру було отримано деталізовані калібрувальні криві з кроком концентрації субстрату в 100 мкМ для групи біосенсорів на основі різних концентрацій КАТ (рис. 6).

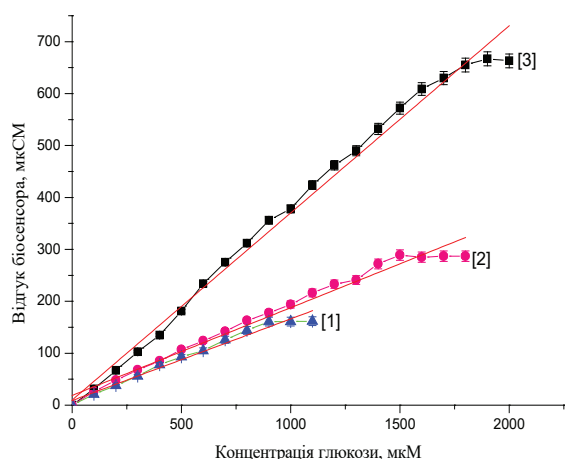


Рис. 6. Калібрувальні криві розроблених біосенсорів на основі 5% ГОД та різних концентраціях КАТ (1–0%, 2–1.33%, 3–5%) в біоселективних елементах. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері з рН 6,2.

На підставі результатів, відображених на рисунку 6, можна зробити висновок, що присутність КАТ в мембрані значно розширює лінійний діапазон роботи біосенсора, а величина такого збільшення діапазону залежить від концентрації допоміжного ферменту (КАТ). Таким чином, результати цього експерименту підтверджують попередні твердження, що кількість каталази впливає на чутливість біосенсора (відгук біферментного біосенсора на основі 5% КАТ збільшується приблизно в 2–2,5 рази порівняно з моноферментним біосенсором).

Перевірка стабільності функціонування біферментного біосенсора

Важливою характеристикою будь-якого біосенсора є відтворюваність відгуків під час безперервної роботи. Досліджувались відгуки моно- та біферментних біосенсорів на однакову концентрацію субстрату протягом кількох годин безперервної роботи (рис. 7). Експеримент для кожного з варіантів біосенсорів проводили в 15 повторах. Для обох варіантів біосенсора значного зниження величини відгуку не спостерігалось, але похибка вимірювання була різною: RSD біферментного біосенсора становила 1,7%, а моноферментного біосенсора – 5,2%. Обидва показники знаходяться в межах норми, але похибка для біосенсора на основі КАТ-ГОД приблизно в 3 рази менша. Скоріше за все покращення відтворюваності

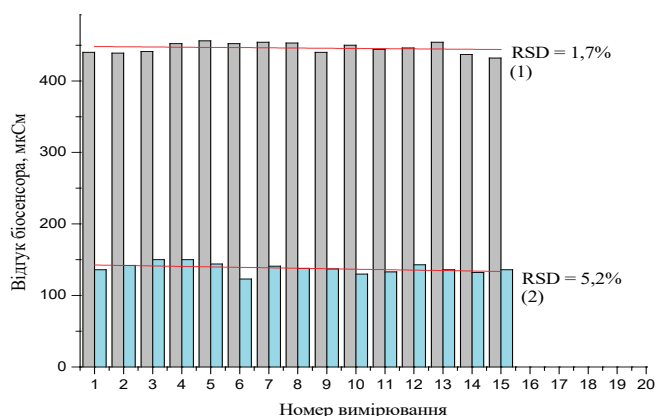


Рис. 7. Відтворюваність відгуків біферментного (1) та моноферментного (2) біосенсора при безперервній роботі впродовж 1 дня. Концентрація глюкози – 2,5 мМ. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері з рН 6,2.

відгуків мультиферментного біосенсора можна пояснити саме нівеляцією нестачі кисню у біоселективній мембрані.

Стабільність біферментного біосенсора під час зберігання була дещо гіршою порівняно з моноферментним біосенсором. Після місяця зберігання в сухому стані при температурі $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ значення відгуку моноферментного біосенсора знизилося на 15% відносно початкового, а падіння активності біферментного біосенсора склало 19%. Однак це не є суттєвою проблемою, оскільки кожне використання біосенсора вимагає калібрування для досягнення максимальної надійності результатів вимірювання.

Іншою важливою характеристикою біосенсора, яку необхідно було дослідити в рамках розробки нового біферментного біосенсора, є відтворюваність процедури приготування біосенсора (інтер-відтворюваність). Для вивчення цієї характеристики було проведено низку іммобілізацій біферментних біосенсорів згідно з оптимізованою методикою, описаною вище. Відразу після кожної іммобілізації було отримано 3 відгуки біосенсорів на однакову концентрацію глюкози. З рисунка 8 видно, що суттєвої різниці в процедурі приготування біосенсорів не спостерігалось, а RSD для 11 серій приготування біосенсора становило 10,7%.

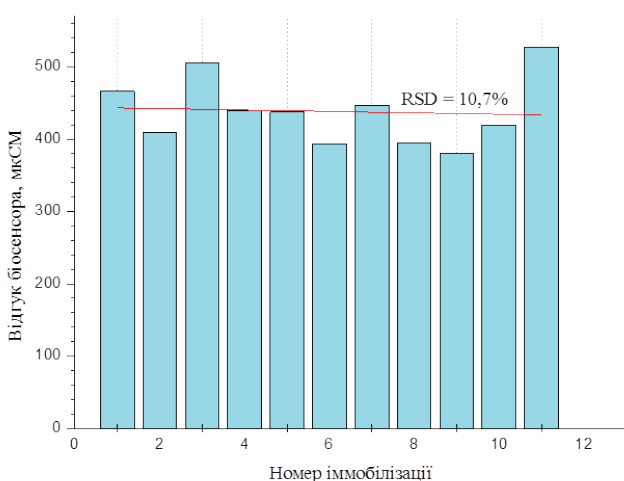


Рис. 8. Інтер-відтворюваність процедури приготування біферментного біосенсора. Концентрація глюкози 2,5 мМ. Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері з рН 6,2.

Для моноферментного біосенсора похибка приготування була, приблизно, на тому ж рівні (RSD = 10%).

Дослідження основних аналітичних характеристик розробленого біферментного біосенсора

Останньою стадією розробки біферментного біосенсора було вивчення його аналітичних характеристик. Для цього були проаналізовані особливості відгуків та калібрувальної кривої за різних умов використання. Отримані аналітичні характеристики були порівняні з такими для референтного методу вимірювань (стандартним моноферментним біосенсором на основі ГОД для вимірювання глюкози). Порівняння аналітичних характеристик обох варіантів біосенсорів для вимірювання глюкози проводилось по таким параметрам: чутливість, динамічний та лінійний діапазони роботи, мінімальна межа визначення, час та стабільність отримання відгуку (час отримання відгуку, тривалість аналізу в цілому, відтворюваність результатів, шум та дрейф базової лінії). Вимірювання проводились в 5 мМ фосфатному буфері з рН 6,2. Мінімальна межа визначення розраховувалась як мінімальна величина відгуку, яка перевищує шум базової лінії втричі. Для моно- та біферментного біосенсорів мінімальні концентрації аналіту становили 16 та 8 мкМ відповідно.

Найбільш істотною відмінністю між моно- та біферментними біосенсорами були параметри, пов'язані з чутливістю біосенсора до глюкози та лінійним діапазоном його функціонування. Чутливість біосенсорів визначалась, як величина відгуку біосенсора на 1 мМ субстрату і становила 378 мксМ/мМ для біферментного біосенсора на основі суміші КАТ-ГОД порівняно з 161 мксМ/мМ для моноферментного біосенсора на основі тільки ГОД. Лінійний діапазон роботи в результаті додавання КАТ до біоселективного елемента розширився більш ніж у два рази і знаходився в діапазоні 0–1700 мксМ для біферментного біосенсора порівняно з 0–800 мксМ для моноферментного. Також було визначено шум та дрейф базової лінії, час отримання одного відгуку та час аналізу в цілому, але між цими

параметрами не спостерігалось суттєвої відмінності.

Ми припускаємо, що таке суттєве покращення характеристик спостерігається за рахунок насичення киснем приелектродного простору біосенсора внаслідок розкладання пероксиду водню каталазою та одночасним усуненням продуктів реакції ГОД. Поки ми уникаємо обмеження ферментативної реакції, що каталізується глюкозооксидазою через нестачу кисню та інгібування зворотньої реакції, концентрація аналіту (глюкози) є єдиним обмежуючим фактором для роботи ГОД і біосенсора, відповідно.

ВИСНОВКИ

У роботі запропоновано метод покращення аналітичних характеристик моноферментного біосенсора на основі ферменту групи оксидаз шляхом коімобілізації з додатковим ферментом (каталазою) з метою підвищення насичення мембрани киснем для кращої роботи оксидази. Зокрема, розроблено та оптимізовано для кількісного визначення глюкози новий високочутливий кондуктометричний біферментний біосенсор на основі ГОД і КАТ. Проаналізовано різні методи коімобілізації ферментів КАТ і ГОД та визначено оптимальну конфігурацію біоселективного елемента.

Було показано, що біосенсор характеризується високою відтворюваністю результатів вимірювань впродовж одного дня (RSD = 1.7%). Також біосенсор характеризувався гарною інтер-відтворюваністю (RSD = 10.7%).

Після оптимізації біосенсора було проведено аналіз основних характеристик біферментного біосенсора у порівнянні з моноферментним. Показано, що розроблений біосенсор характеризується високою чутливістю (378 мкСм/мМ, що приблизно в 2,3 рази вище порівняно з 161 мкСм/мМ для моноферментного біосенсора) до цільового аналіту. При цьому спостерігалось значне розширення лінійного діапазону від 0–800 (моноферментний) до 0–1700 мкМ (біферментний). Також було досліджено інші аналітичні характеристики.

За результатами досліджень встановлено, що використання каталази покращило роботу

біосенсора на основі ферменту ГОД, а також підтвердило, що технологія додавання додаткового ферменту до біомембрани біосенсора може бути використана для покращення його аналітичних характеристик. У свою чергу, покращення характеристик біосенсорів на основі ферментів класу оксидаз дозволяє більш ефективно використовувати їх у різних галузях: медицині, виробництві та контролі якості фармацевтичних препаратів тощо.

ПОДЯКА

Роботу виконано за підтримки Національного фонду досліджень України в рамках конкурсу проектів НДР «Наука для відбудови України у воєнний та повоєнний періоди» (проект 2022.01/0043) та фонду Саймонс (США).

Список використаної літератури

- [1]. A. Haleem, M. Javaid, R. P. Singh, R. Suman, S. Rab, *Sensors International*, 2021, 2, 100121.
- [2]. S. Gavrilas, C.Ş. Ursachi, S. Perța-Crișan, F.D. Munteanu, *Sensors (Basel)*, 2022, 22(4), 1513.
- [3]. R. Shams, J. Singh, S. Ashraf, M. Manzoor, A. Dar, *Journal of Postharvest Technology*, 2020, 08(1), pp.53–74.
- [4]. A. Woldu, *International Journal of Scientific and Engineering Research*, 2022, 13, pp.12–29.
- [5]. P. Mehrotra, *Oral. Biol. Craniofac. Res.*, 2016, 6(2), pp.153–159.
- [6]. B. Bucur, C. Purcarea, S. Andreescu, A. Vasilescu, *Sensors*, 2021, 21(9), 3038.
- [7]. J. Wu, H. Liu, W. Chen, B. Ma, H. Ju, *Nat. Rev. Bioeng.*, 2023, 1, pp.346–360.
- [8]. P. Luppá, G. Proll, M. Imhoff, T. Koschinsky, in *Point-of-care testing Principles and Clinical Applications, Analytical methods, biosensor technology* (Eds: P. Luppá, R. Junker), Springer Berlin, Heidelberg 2018, pp.37–46.
- [9]. V. Melnyk, A. Vasylenko, L. Semenycheva, O. Slitskyi, O. Saiarina, S. Dzyadevych, *Engineering Research Express*, 2021, 3, 045008.

- [10]. Y. Li, H.J. Schluesener, S. Xu, *Gold Bull*, 2010, 43, p.29–41.
- [11]. J. Wang, Y. Ren, B., in *Advances in Microfluidic Technologies for Energy and Environmental Applications, Application of Microfluidics in Biosensors* (Ed: Y. Ren), IntechOpen, 2020, ch.4.
- [12]. S. Vigneshvar, C.C. Sudhakumari, B. Senthilkumaran, H. Prakash, *Sec. Bioprocess Engineering*, 2016, 4, 20163.
- [13]. O. O. Soldatkin, O. V. Soldatkina, I. I. Piliponski, L. S. Rieznichenko, T. G. Gruzina, S. M. Dybkova, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, *Appl Nanosci*, 2022, 12, pp. 995–1003.
- [14]. O. O. Soldatkin, E. Soy, A. Errachid, N. Jaffrezic-Renault, B. Akata, A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych, *Sensor Letters*, 2011, 9(6), pp.2320–2326.
- [15]. Ramanavicius, S.; Ramanavicius, A., *Nanomaterials*, 2021, 11, p.371.
- [16]. Ramanaviciene, A.; German, N.; Kausaite-Minkstimiene, A.; Ramanavicius, A., *Chemosensors*, 2021, 9, p.188.
- [17]. Sakalauskiene, L.; Popov, A.; Kausaite-Minkstimiene, A.; Ramanavicius, A.; Ramanaviciene, A., *Biosensors*, 2022, 12, p.320.
- [18]. Sobolevskiy, M.S., Soldatkin, O.O., Lopatynskiy, A.M. et al. Application of modified gold nanoparticles to improve characteristics of DNA hybridization biosensor based on surface plasmon resonance spectrometry. *Appl Nanosci* 13, 7521–7529 (2023). <https://doi.org/10.1007/s13204-023-02930-2>
- [19]. O. Soldatkin, V. Arkhypova, I. Kucherenko, D. Kucherenko, S. Dzyadevych, *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*, 2021, 18, pp. 11–26.
- [20]. O. Soldatkina, I. Kucherenko, O. Soldatkin, V. Pyeshkova, O. Dudchenko, B. Akata Kurç, S. Dzyadevych, *Applied Nanoscience*, 2018, 9, pp. 737–747.
- [21]. I. S. Kucherenko, O. O. Soldatkin, S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1111, pp. 114–131.
- [22]. U. Wollenberger, F. Schubert, D. Pfeiffer, F. W. Scheller, *Trends in Biotechnology*, 1993, 11, pp. 255–262.
- [23]. K. Berketa, O. Saiapina, L. Fayura, A. Sibirny, S. Dzyadevych, O. Soldatkin, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2022, 367, 132023.
- [24]. V. G. Melnyk, A. D. Vasilenko, A. V. Slitskiy, S. V. Dzyadevych, *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*, 2015, 12, pp. 51–59
- [25]. O. Soldatkin, O. Soldatkina, I. Piliponskiy, L. Rieznichenko, T. Gruzina, S. Dybkova, S. Dzyadevych, A. Soldatkin., *Applied Nanoscience*, 2021, 12.
- [26]. S. V. Dzyadevych, A. P. Soldatkin, V. M. Arkhypova, O. A. Shul'ga, G. V. El'skaya, *Ukr.Biochem.J.*, 1995, 67, pp.53–59.
- [27]. A. P. Soldatkin, A. V. El'skaya, A. A. Shul'ga, A. S. Jdanova, S. V. Dzyadevich, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, P. Clechet, *Analytica Chimica Acta*, 1994, 288(3), pp.197–203.
- [28]. O. Y. Dudchenko, V. M. Pyeshkova, O. O. Soldatkin, B. Akata Kurç, B. O. Kasap, A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych, *Nanoscale Res Lett*, 2016, 11, 59.

Стаття надійшла до редакції 15.05.2024 р.

PACS 543.555+577.15+543.06

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2024.2.307066>

**IMPROVEMENT OF THE ANALYTICAL CHARACTERISTICS OF
OXIDASE-BASED ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS BY ADDING AN
ADDITIONAL ENZYME – CATALASE TO THE BIOSELECTIVE
MEMBRANE**

Kseniia Berketa^{1,2}, Sergiy Dzyadevych^{1,2}, Oleksandr Soldatkin¹

¹ Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine,
150 Zabolotnogo Str., 03680, Kyiv, Ukraine

² Taras Shevchenko National University of Kyiv, 60 Volodymyrska Street, Kyiv, Ukraine, 01033
E-mail: ksenya.berketa.10@gmail.com

Summary

Enzymatic biosensors are the most widespread among electrochemical biosensors due to their high selectivity and speed of analysis. Of course, there are a number of problems that may arise in the development of enzyme biosensor systems, in particular, a short linear range of analyte determination or an insufficient minimum limit of its determination. As a result, improving the analytical characteristics of enzyme biosensors is one of the main tasks in their development.

One of the successful approaches to improving the parameters of biosensors is the use of several enzymes in the composition of bioselective elements. The creation of multi-enzyme bioselective elements can be useful for improving the analytical characteristics of already existing biosensors, for example, by improving their sensitivity or expanding the linear range of biosensor operation due to additional enzymatic reactions.

Therefore, we proposed a method of improving the analytical characteristics of a mono-enzyme biosensor based on an enzyme of the oxidase group by coimmobilization with an additional enzyme (catalase) in order to increase the oxygen saturation of the membrane for better oxidase performance. In particular, a new highly sensitive conductometric bienzymatic biosensor based on GOx and CAT was developed and optimized for the quantitative determination of glucose. Different methods of coimmobilization of CAT and GOx enzymes were analyzed and the optimal configuration of the bioselective element was determined.

According to the results of the research, it was established that the use of catalase improved the work of the biosensor based on the GOx enzyme, and also confirmed that the technology of adding an additional enzyme to the biomembrane of the biosensor can be used to improve its analytical characteristics. In turn, improving the characteristics of biosensors based on enzymes of the oxidase class allows them to be used more effectively in various fields: medicine, production and quality control of pharmaceuticals, etc.

Keywords: analytical methods, bi-enzyme biosensor, catalase, conductometric transducer, oxidoreductases, biosensor analytical characteristics

PACS 543.555+577.15+543.06

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2024.2.307066>

ПОКРАЩЕННЯ АНАЛІТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ БІОСЕНСОРІВ НА ОСНОВІ ФЕРМЕНТІВ КЛАСУ ОКСИДАЗ ЗА ДОПОМОГОЮ ДОДАВАННЯ У БІОСЕЛЕКТИВНУ МЕМБРАНУ ДОПОМІЖНОГО ФЕРМЕНТУ – КАТАЛАЗИ

Беркета Ксенія^{1,2}, Дзядевич Сергій^{1,2}, Солдаткін Олександр¹

¹ Інститут молекулярної біології та генетики НАНУ, вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

² Київський національний університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 60, Київ, Україна, 01033

E-mail: ksenya.berketa.10@gmail.com

Реферат

Ферментні біосенсори є одними з найбільш розповсюджених серед електрохімічних біосенсорів через їхню високу селективність та швидкість аналізу. Звісно, існує ряд проблем, що можуть виникнути при розробці ферментних біосенсорних систем, зокрема, короткий лінійний діапазон визначення аналіту або недостатня мінімальна границя його визначення. Як наслідок – покращення аналітичних характеристик ферментних біосенсорів є одним з головних завдань при їх розробці.

Одним з успішних підходів покращення параметрів біосенсорів є використання декількох ферментів в складі біоселективних елементів. Створення мультиферментних біоселективних елементів може бути корисним для покращення аналітичних характеристик вже існуючих біосенсорів, наприклад, через покращення їхньої чутливості або розширення лінійного діапазону роботи біосенсора за рахунок додаткових ферментативних реакцій.

Тож, нами було запропоновано метод покращення аналітичних характеристик моноферментного біосенсора на основі ферменту групи оксидаз шляхом коїммобілізації з додатковим ферментом (каталазою) з метою підвищення насичення мембрани киснем для кращої роботи оксидази. Зокрема, розроблено та оптимізовано для кількісного визначення глюкози новий високочутливий кондуктометричний біферментний біосенсор на основі ГОД і КАТ. Проаналізовано різні методи коїммобілізації ферментів КАТ і ГОД та визначено оптимальну конфігурацію біоселективного елемента.

За результатами досліджень встановлено, що використання каталази покращило роботу біосенсора на основі ферменту ГОД, а також підтвердило, що технологія додавання додаткового ферменту до біомембрани біосенсора може бути використана для покращення його аналітичних характеристик. У свою чергу, покращення характеристик біосенсорів на основі ферментів класу оксидаз дозволяє більш ефективно використовувати їх у різних галузях: медицині, виробництві та контролі якості фармацевтичних препаратів тощо.

Ключові слова: аналітичні методи, біферментний біосенсор, каталаза, кондуктометричний перетворювач, оксидоредуктази, аналітичні характеристики біосенсора