

УДК 543.9, 543.553.8, 577.15.08

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.3.339804>

РОЗРОБКА АМПЕРОМЕТРИЧНОГО ГЛУТАМАТ-ЧУТЛИВОГО БІОСЕНСОРА НА ОСНОВІ АДСОРБОВАНОЇ НА СИЛІКАЛІТІ ГЛУТАМАТОКСИДАЗИ

*О. В. Солдаткіна*¹, <https://orcid.org/0009-0009-6165-7421>

*Д. О. Мруга*¹, <https://orcid.org/0000-0002-0689-598X>

*Д. Ю. Кучеренко*¹, <https://orcid.org/0009-0006-7640-5401>

*І. С. Кучеренко*¹, <https://orcid.org/0000-0001-8774-5272>

О. О. Солдаткін^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0003-2362-5487>

Б. Аката Курч^{3,4}, <https://orcid.org/0000-0002-4337-5537>

С. В. Дзядевич^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0003-2915-716X>

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

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

³ Близькосхідний технічний університет, Кафедра мікро- та нанотехнологій,
Анкара, 06531, Туреччина.

⁴ Близькосхідний технічний університет, Центральна лабораторія,
Анкара, 06531, Туреччина.

e-mail: olgasoldatkina@yahoo.com; alex_sold@yahoo.com;

didukh.d@gmail.com; kucherenko.i.s@gmail.com;

darynamruga@gmail.com; akata@metu.edu.tr; dzyad@yahoo.com

Анотація. В роботі розроблено нову конструкцію амперометричного біосенсора для високочутливого та селективного виявлення глутамату з використанням нетипового методу іммобілізації глутаматоксидази шляхом адсорбції її на шарі наночастинок силікаліту. Було оптимізовано процедуру виготовлення біосенсора, а саме визначено основні параметри модифікації амперометричних платинових перетворювачів наночастинами силікаліту, а також підібрано оптимальні умови адсорбції глутаматоксидази на цьому шарі.

Біосенсиори на основі глутаматоксидази, адсорбованої на силікаліті, продемонстрували високу чутливість до низьких концентрацій глутамату. Лінійний діапазон виявлення становив від 2,5 мкМ до 450 мкМ, а межа виявлення глутамату становила 1 мкМ. Також в роботі було показано, що запропоновані біосенсиори характеризуються високою відтворюваністю відгуків протягом кількох годин безперервної роботи (RSD до 7%) та гарною операційною стабільністю протягом кількох днів.

Після проведення усього комплексу робіт по розробці та оптимізації нового глутамат-чутливого біосенсора, встановлено, що такого плану сенсори із заявленими аналітичними характеристиками можуть використовуватись для визначення низьких концентрацій глутамату в реальних біологічних рідинах.

Ключові слова: силікаліт; ензим; біосенсор; глутаматоксидаза; амперометрія; глутамат

Вступ

Глутамат (глутамінова кислота) відіграє важливу роль в життєдіяльності організму людини і інших ссавців, особливо у функціонуванні центральної нервової системи (ЦНС). Зокрема, глутамат є основним збуджуючим нейротрансмітером в ЦНС ссавців. Також він відіграє важливу роль в азотистому обміні. Концентрація глутамату в окремих частинах організму може впливати на розвиток інфарктів, інсультів та різні нейропатологічні стани [1, 2].

Глутамат входить до складу багатьох фармацевтичних препаратів завдяки тому, що він має здатність сенсibilізувати смакові рецептори і стимулювати діяльність мозку. Також в невеликих кількостях він міститься в багатьох продуктах харчування [3, 4]. Присутність в їжі глутамату надає їй «м'ясного» смаку, тому глутамат часто застосовують в якості підсилювача смаку, додаючи його до багатьох харчових продуктів. Тому повністю виключити глутамат із раціону харчування досить проблематично. У чутливих до глутамату людей може розвиватися так званий «синдром китайського ресторану» [5, 6]. До того ж, глутамат негативно впливає на сітківку ока і може сприяти погіршенню зору.

Визначення глутамату займає важливе місце в клінічній біохімії при діагностиці захворювань, що пов'язані з різкими змінами рівня глутамату в організмі, зокрема хвороб печінки та серцево-судинної системи [5, 7]. Також, в клінічних лабораторіях аналіз концентрації глутамату використовують під час визначення активності деяких амінотрансфераз.

Таким чином, область практичного застосування глутамату, як маркеру різних захворювань безперервно збільшується. Через це виникає потреба в методах точної та швидкої детекції концентрації глутамату для потреб нейрофізіології і нейропатології, фундаментальної та клінічної медицини, фармацевтичної та харчової промисловості, а також в аналітичній біохімії та біотехнології [1, 5, 7].

Сучасні стандартні методи високоточного визначення глутамату, такі як спектрофотоме-

трія та рідинна хроматографія, потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання [1, 5, 8, 9].

Крім згаданих вище традиційних методів аналізу глутамату, також використовують хе-молюмінесцентне визначення за участю люмінолу і фериціаніду калію із застосуванням люмінофотометра [10]. Споживання кисню при окисленні глутамату може бути зафіксоване кисневим волоконно-оптичним датчиком, який фіксує зміни люмінесценції спеціально нанесеного шару, чутливого до концентрації кисню [3]. Для визначення кількості глутамату у м'ясі та м'ясних продуктах використовується метод на основі двох ензиматичних реакцій, в результаті яких окислюється глутамат і утворюється кольорова сполука (формазан), концентрація якої вимірюється на спектрофотометрі [11].

Недоліком наведених вище методів є необхідність досить складної попередньої підготовки проб для аналізу і непридатність цих методів для швидкого аналізу великої кількості зразків, або для моніторингу в режимі реального часу. Способом вирішення указаних вище проблем є використання нових біоаналітичних приладів – біосенсорів [12].

На даний час, в світі, вже розроблено низку біосенсорних системи для визначення глутамату в різних реальних зразках: продуктах харчування і фармацевтичних препаратах [1, 7], культурах клітин [13, 14], сироватці крові, сечі [1, 5], мікродіалізатах при нейрофізіологічних дослідженнях [2, 15] та при контролі за процесом ферментації в харчовій промисловості [16, 17]. Кожна з цих відомих розробок має як свої переваги так і недоліки, тому розробка нових методів створення глутамат-чутливих біосенсорів із покращеними аналітичними характеристиками є вельми актуальною.

Метою даного дослідження є створення такого амперометричного біосенсора для визначення глутамату, який би дозволив більш швидко та точно визначати концентрацію цього аналіту, та був би більш перспективним та дешевим для подальшого масового виробництва. Поставлена задача вирішується за рахунок використання нового методу іммобілізації

ензиму, а саме - адсорбції глутаматоксидази на платинових перетворювачах, вкритих шаром силікаліту.

Вперше ефективність застосування різних типів силікалітів як перспективних носіїв для іммобілізації ензимів була показана при розробці кондуктометричних біосенсорів [17-21]. Методика адсорбції ензиму на силікаліті при створенні біосенсорів була апробована для низки ензимів: ацетилхолінестераза [21], бутерилхолінестераза [21], уреаза [17, 19]. Крім того, ефективність даної методики була продемонстрована для ензимних біосенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів [22-26]. Також, було показано, що деякі силікаліти можуть бути ефективно використані для адсорбції глюкозооксидази при розробці амперометричних біосенсорів для визначення глюкози [27]. Відповідно, було вирішено спробувати використати дану методику іммобілізації для розробки нового амперометричного глутамат-чутливого біосенсора на основі глутаматоксидази, адсорбованої на силікаліті, що буде характеризуватись покращеними аналітичними характеристиками.

Матеріали та методи

Матеріали

Глутаматоксидазу (ГлОД), ЕС 1.4.3.11 із *Streptomyces sp.* активністю 7 од/мг (Yamasa Corporation, Токіо, Японія) було використано в складі біоселективних елементів біосенсорів. Бичачий сироватковий альбумін БСА, (фракція V), гліцерин, аскорбінову кислоту, HEPES та 50% водний розчин глутарового альдегіду (ГА) було отримано від Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина). L-глутамат було отримано від Affymetrix (США). Всі інші хімічні речовини були вітчизняного виробництва та мали аналітичну чистоту.

Синтез та характеристика кристалів силікаліту.

Для синтезу розчину силікаліту використовували 1ТРАОН: 4ТЕОС: 350 × Н₂О. Гомогенний розчин силікаліту отримували гідролізуючи тетраетоксисилан (ТЕОС) гідроксидом тетрапропіламонію (ТРА-ОН) при постійному перемішуванні протягом 6 годин за кімнатної температури. Кристалізацію проводили за температури 125 °С протягом одного дня. Речовина, яка не прореагувала, була видалена із розчину методом центрифугування. Розмір отриманих частинок силікаліту становив приблизно 400 нм.

Отримані зразки були охарактеризовані за допомогою порошкової рентгенівської дифракції з використанням нікелевого фільтрованого Cu-Kα випромінювання на приладі Philips PW 1729. Скануючу електронну мікроскопію проводили після покриття AuPb на приладі 400 Quanta FEI. Аналіз енергодисперсійної рентгенівської спектроскопії усіх зразків проводили за допомогою рентгенівського аналізатора Phoenix EDAX, оснащеного надтонким віконним детектором Sapphire, підключеним до приладу Hitachi S-4700 FE-SEM. Експерименти з адсорбції/десорбції азоту проводилися за допомогою приладу серії NOVA 3000 (Quanta-chrome Instruments). Площа поверхні зразків досліджувалась за допомогою Multipoint BET, а розмір пор та об'єм було встановлено методами Сайто-Фолі та методом Т-діаграми. Підготовка зразків включала дегазацію зразків у вакуумі при 300 К протягом 4 годин безпосередньо перед аналізом. Згідно з даними рентгенівської дифракції, всі зразки демонстрували характерні дифракційні лінії своїх структур. У табл. 1 наведено співвідношення Si/Al, розміри частинок, розміри пор, площі зовнішньої та загальної поверхні, об'єми мікро- та мезопор.

Таблиця 1

Характеристика силікалітів

Зразок	Si/Al	Розмір частинки (нм)	Діаметр пор (нм)	S _{пор} (м ² /г)	S _{поверхні} (м ² /г)
Силікаліт	без Al	~400	0,45	52	185

Конструкція амперометричних перетворювачів

Як амперометричні перетворювачі в роботі використовували платинові дискові електроди власного виробництва (рис. 1). Вони були виготовлені наступним чином. Платиновий дріт довжиною 3 мм діаметром 0,4 мм був запаяний у торцеву частину скляного капіляра із зовнішнім діаметром 3,5 мм. Відкритий кінець дроту служив робочою поверхнею перетворювача. Цей платиновий дріт був з'єднаний плавким сплавом Вуда з провідником всередині капіляра. До іншого кінця провідника прикріплювалась контактна площадка для з'єднання з вимірювальною установкою. Поверхня робочого електрода була отримана шляхом шліфування порошком оксиду алюмінію (частинки 0,1 мкм та 0,05 мкм) та оброблена спиртом безпосередньо перед іммобілізацією біоселективного елемента. Поверхня електрода періодично відновлювалась за допомогою описаної процедури шліфування.

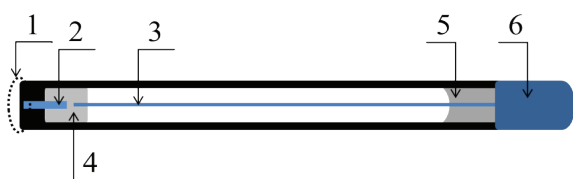


Рис. 1. Схема платинового дискового електрода.

1 – біоселективна мембрана, 2 – платиновий дріт, 3 – внутрішній провідник, 4 – сплав Вуда, 5 – епоксидна смола, 6 – контактна площадка.

Модифікація поверхні платинових електродів силікалітом

Для формування шару силікаліту на робочій поверхні електрода використовували 0,15 мкл 2,5 % розчину силікаліту в 20 мМ HEPES, рН 6,5, який наносили на активну зону амперометричного перетворювача на основі платинового дроту, після чого перетворювач нагрівали протягом 1 – 1,5 хв до 150 °С, в результаті чого приелектродний шар силікаліту закріплювався на платиновій поверхні. Такий короткостроковий температурний вплив не змінював ні структуру силікаліту, ні робочі параметри амперометричного перетворювача.

Адсорбція ензиму на вкритий силікалітом перетворювач

З метою нанесення біоселективних мембран на перетворювачі, вкриті силікалітом, використовували 0,1 мкл 4% розчину ГлОД у 20 мМ HEPES, рН 6,5, який наносили на активну зону платинового перетворювача, попередньо покриту силікалітом, і витримували на повітрі до повного висихання (протягом 5 хв). При цьому не використовували ні глутаровий альдегід, ні будь-які інші допоміжні сполуки. Після цього перетворювач занурювали в робочий буфер на 20-30 хв для вимивання незв'язаного ензиму. По завершенню експериментів, для відновлення амперометричного перетворювача, платинову поверхню очищали від силікаліту та адсорбованого ензиму за допомогою ватного диску, змоченого етанолом.

Експериментальна установка для проведення амперометричних вимірювань

В роботі використовували триелектродну схему амперометричного аналізу. Робочі амперометричні перетворювачі підключали до потенціостата PalmSens (Нідерланди) разом із допоміжним платиновим електродом (зі значно більшою площею платинової поверхні порівняно з робочим електродом) та електродом порівняння Ag/AgCl (рис. 2).

В процесі амперометричного аналізу кожен електрод відіграє певну функцію. При прикладанні до робочого електрода позитивного потенціалу відбувається окиснення всіх молекул розчину на його поверхні, і електрон переходить із розчину на електрод. В разі відсутності допоміжного електрода, утворювалась би велика різниця потенціалів через стехіометричний дисбаланс. Отже, функція допоміжного електрода полягає у формуванні зовнішнього кола, що забезпечує електронам шлях назад до розчину. Третій електрод – це електрод порівняння, що містить відому хімічну сполуку, яка включає обидві форми окисно-відновної пари. Зазвичай це або Hg/HgCl₂ (насичений каломель), або Ag/AgCl (срібло/хлорид срібла) електрод. Оскільки прикладений потенціал фіксований, електрод порів-

няння має стабільну точку, яку може використовувати робочий електрод для вимірювання. Тобто, прикладений потенціал між робочим та опорним електродами контролюється за допомогою електроду порівняння, тоді як струм вимірюється між робочим та допоміжним електродами [11].

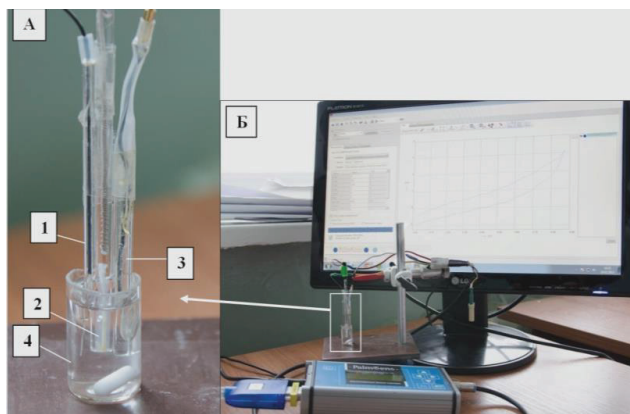


Рис. 2. Загальний вигляд вимірювальної комірки з трьома електродами (а): 1 - допоміжний електрод, 2 - Ag/AgCl електрод порівняння, 3 - робочий електрод, 4 - робоча комірка, що містить 2 мл буферного розчину, (б) прилад для амперометричних вимірювань.

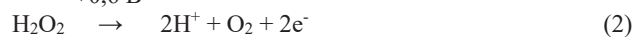
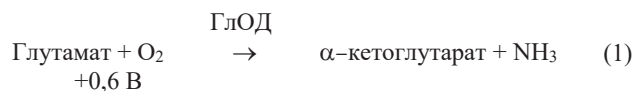
Процедура вимірювання

Вимірювання проводили в 25 мМ НЕРЕС, рН 7,4, у хроноамперометричному режимі за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння у відкритій комірці із інтенсивним перемішуванням. Концентрацію субстрату у вимірювальній комірці задавали шляхом внесення аліквот стандартного концентрованого розчину субстрату в робочий буфер. Всі експерименти проводили щонайменше у трьох повторях.

Результати та обговорення

Робота запропонованого амперометричного біосенсора для визначення глутамату базується на ензиматичній реакції (1) у біоселективній мембрані, яка полягає в окисленні глутамату та утворенні електрохімічно активного пероксиду водню. При подачі позитивного потенціалу на платиновий робочий електрод (2) відбувається реакція розкладання пероксиду водню, що приводить до генерації електронів,

які безпосередньо реєструються амперометричним перетворювачем:



Першим етапом даної роботи було оптимізувати методику адсорбції ензиму на силікаліті для створення амперометричного біосенсора на основі ГлОД для визначення глутамату. Кількість ензиму, яка може адсорбуватися на перетворювачі, залежить в першу чергу від кількості сорбенту (силікаліту). На величину площу поверхні шару силікаліту може впливати як концентрація самого силікаліту так і час формування цього шару.

Для цього, спочатку, процедуру нанесення 5% силікаліту на перетворювач повторювали декілька раз для різного часу (від 10 до 960 секунд) нагрівання в печі до 150 °С. Різний час нагріву вкритого шаром силікаліту перетворювача давав змогу контролювано збільшити кількість силікаліту на перетворювачі та дослідити, як цей параметр впливає на кінцеву чутливість біосенсора до глутамату (1 мМ). Залежність відгуків біосенсора від часу нагрівання силікаліту на поверхні електрода представлено на Рис. 3.

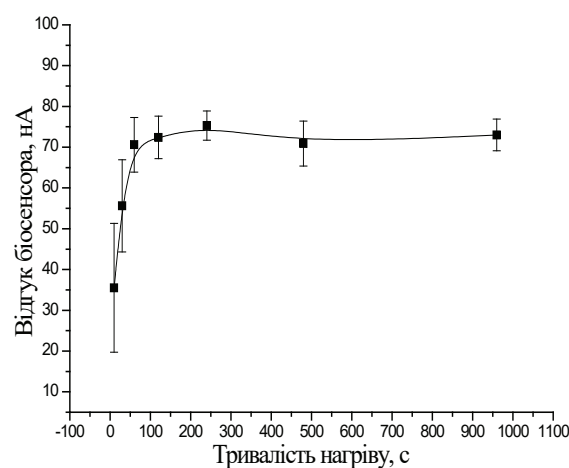


Рис. 3. Залежність відгуків біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті ГлОД від тривалості нагріву силікаліту для закріплення на перетворювачі. Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Концентрація глутамату – 1 мМ.

Як видно з рисунку, час формування шару силікаліту на поверхні платинового електроду має бути щонайменше 60-90 секунд.

Далі необхідно було визначити, розчин силікаліту якої концентрації буде оптимальним для адсорбції саме ГлОД на поверхні амперометричного перетворювача, вкритого силікалітом (рис.4). Відповідно було перевірено чутливість низки біосенсорів, виготовлених на перетворювачах, вкритих силікалітом за різної його концентрації (0,25-10%). Нанесення 2,5% силікаліту значно збільшувало активність біоселективного елементу у порівнянні з нанесенням 0,25% силікаліту, однак подальше збільшення концентрації вже не давало значного ефекту. Тому в наступних дослідженнях ГлОД адсорбували саме на амперометричні перетворювачі, вкриті 2,5% силікалітом.

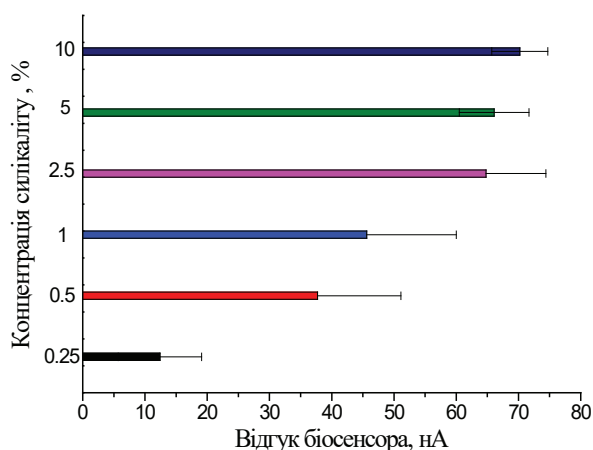


Рис. 4. Залежність відгуків біосенсора на основі ГлОД, адсорбованої на силікаліті, від концентрації силікаліту, що наносився на перетворювач протягом 90 секунд. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Концентрація глутамату – 1 мМ.

Метою наступного етапу роботи було підібрати оптимальні умови адсорбції ГлОД на силікаліті, оскільки ми очікували значну залежність ефективності адсорбції від її часу та концентрації ензиму. Ефективність адсорбції ГлОД ми оцінювали за величиною відгуків біосенсора. Як не дивно, в діапазоні часу адсорбції 2-30 хв. величина відгуків біосенсора

була приблизно однакова, тому за оптимальний час було прийнято 5 хв, оскільки цього було достатньо для повного висихання краплі з ензимом, яка була нанесена на амперометричний перетворювач вкритий шаром силікаліту.

Більш виражені ефекти були отримані при зміні концентрації ензиму в процедурі формування мембрани. На рис. 5 приведено результати експерименту по вивченню впливу концентрації ГлОД при формуванні мембран на величину відгуків біосенсора.

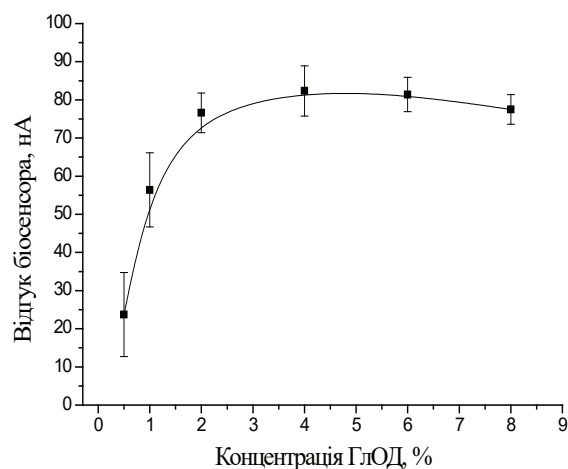


Рис. 5. Залежність величини відгуків біосенсора на основі ГлОД, адсорбованої на силікаліті, від концентрації ензиму. Вимірювання проводили в 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Концентрація глутамату – 1 мМ.

Після оптимізації методики покриття амперометричного перетворювача на основі платинового дискового електроду шаром силікаліту та методики адсорбції ГлОД на силікаліті, було перевірено основні аналітичні характеристики отриманого біосенсора для визначення глутамату.

Для демонстрації роботи біосенсора за оптимальних умов, було проаналізовано типові відгуки біосенсора на основі ГлОД, адсорбованої на силікаліті, на внесення різних концентрацій глутамату. Типові відгуки біосенсора були досить вираженими з незначним шумом базової лінії. Мінімальний час реакції біосенсора на внесення аліквот концентрованих розчинів глутамату становив 20-30 с.

З використанням цих відгуків було побудовано калібрувальну криву чутливості біосенсора до глутамату. Типову калібрувальну криву визначення глутамату для біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті ГлОД наведено на рис. 6. Лінійний діапазон концентрацій становив 2,5 мкМ - 200 мкМ. Чутливість біосенсора

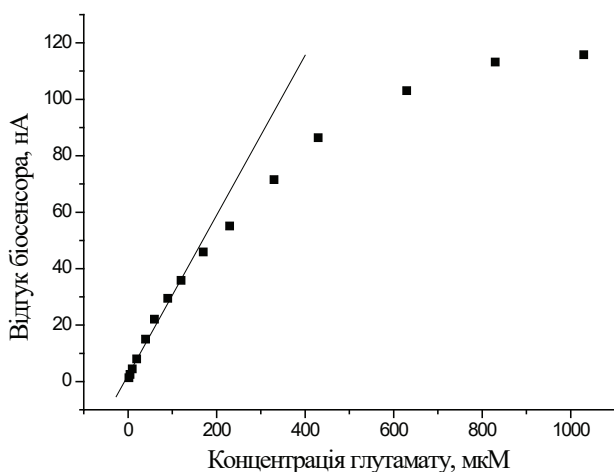


Рис. 6. Калібрувальна крива визначення глутамату біосенсором на основі ГлОД, адсорбованої на силікаліті. Вимірювання проводили в 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

до глутамату становила 0,5 нА/мкМ. Типовий розроблений біосенсор мав межу виявлення близько 0,5 мкМ глутамату (її вимірювали як концентрацію глутамату, відгук на яку втричі більший за базовий шум).

Для нормального функціонування будь якого біосенсора дуже важливими є такі характеристики як відтворюваність та операційна стабільність сигналу. Для визначення відтворюваності відгуків біосенсора на основі ГлОД, адсорбованої на силікаліті, впродовж робочого дня отримували відгуки на дві концентрації глутамату (0,5 та 1 мМ) з інтервалом між сигналами в 20 хвилин, при цьому біосенсор весь час між вимірюваннями залишався у буферному розчині за постійного перемішування (Рис. 7). Похибка при вимірюваннях глутамату становила 5,7% та 6,9%, відповідно.

З метою дослідження операційної стабільності біосенсора на основі ГлОД адсорбованої

на силікаліті, щоденно протягом 4-х днів, проводився типовий експеримент, а саме отримували по 9 послідовних відгуків біосенсора на 1 мМ глутамату. При цьому сам біосенсор весь час між вимірюваннями залишався у буферному розчині при постійному перемішуванні, а після серії з 9-ти вимірів біосенсор у сухому стані поміщували в холодильник (+4 °С). Як можна побачити з рис. 8. біосенсор на основі

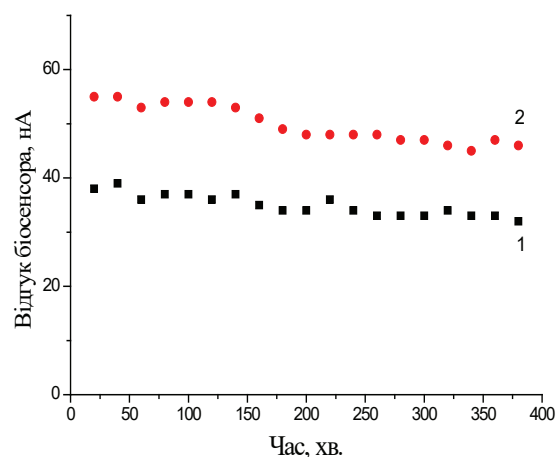


Рис. 7. Відтворюваність відгуків біосенсора на основі ГлОД, адсорбованої на силікаліті, на внесення 0,5 мМ (1) та 1 мМ (2) глутамату протягом безперервної роботи протягом дня. Вимірювання проводили в 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

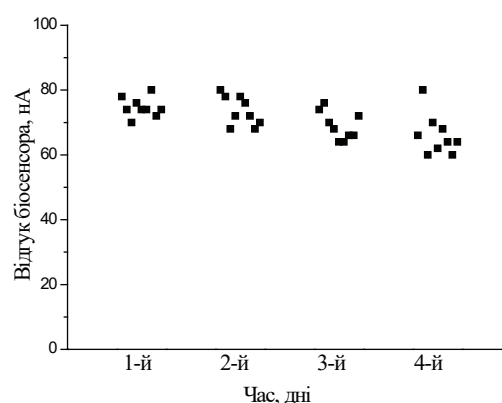


Рис. 8. Операційна стабільність відгуків біосенсора на основі ГлОД, адсорбованої на силікаліті, протягом чотирьох днів функціонування. Вимірювання проводили в 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Концентрація глутамату – 1 мМ.

адсорбованої на силікаліті ГлОД протягом 4-х днів характеризувався гарною операційною стабільністю.

Відповідно, аналізуючи усі результати щодо розробки та оптимізації нового амперометричного біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті ГлОД для визначення глутамату, можна зазначити, що в роботі успішно застосовано новий метод іммобілізації, а саме адсорбцію ГлОД на шарі силікаліту, для створення високочутливого та стабільного біосенсора для визначення концентрацій глутамату. Сам запропонований біосенсор характеризувався гарними аналітичними характеристиками, що дають можливість в подальшому з успіхом використовувати його для аналізу реальних біологічних зразків.

Висновки

Розроблено новий амперометричний глутамат-чутливий біосенсор на основі адсорбції ГлОД на амперометричному дисковому платиновому електроді, вкритому шаром силікаліту. Запропоновано оптимальні процедури нанесення шару силікаліту на платиновий дисковий електрод та адсорбції ГлОД на шарі силікаліту. Показано, що біосенсор, створений з урахуванням оптимізованих умов іммобілізації, характеризується високою чутливістю до глутамату (мінімальна межа виявлення - 0,5 мкМ), широким лінійним діапазоном роботи (2,5 - 200 мкМ), а також високою відтворюваністю відгуків при безперервній роботі (RSD до 7%) та гарною операційною стабільністю роботи протягом щонайменше 4 днів. Відповідно, розроблений біосенсор на основі ГлОД, адсорбованої на силікаліті, є перспективним приладом для подальшого його застосування для аналізу концентрації глутамату в реальних біологічних рідинах.

Подяка

Роботу виконано за підтримки НАН України в рамках виконання робіт за напрямком використання бюджетних коштів «Підтримка пріоритетних для держави наукових досліджень і науково-технічних (експериментальних) розробок» бюджетної програми КПКВК 6541230 (договір 2/9-2025). Робота була також підтримана грантом Фонду Саймонса № SFI-PD-Ukraine-00017453 (Сергій Дзядевич, Олександр Солдаткін та Дарина Мруга).

джені і науково-технічних (експериментальних) розробок» бюджетної програми КПКВК 6541230 (договір 2/9-2025). Робота була також підтримана грантом Фонду Саймонса № SFI-PD-Ukraine-00017453 (Сергій Дзядевич, Олександр Солдаткін та Дарина Мруга).

Список використаної літератури

- [1]. Villarta RL, Cunnigham DD, Guilbault GG: Amperometric enzyme electrodes for the determination of L-glutamate. *Talanta* 1991, 38:1:49-55.
- [2]. Berners MOM, Boutelle MG, Fillenz M: Online measurement of brain glutamate with an enzyme/polymer-coated tubular electrode. *Anal Chem* 1994, 66:13:2017-2021.
- [3]. Dremel BAA, Schmid RD: Comparison of two fibre-optic L-glutamate biosensors based on the detection of oxygen or carbon dioxide and their application in combination with flow-injection analysis to the determination of glutamate. *Anal Chim Acta* 1991, 248:351-359.
- [4]. Vahien W, Bradley J, Bilitewski U, Schmid RD: Mediated enzyme electrode for the determination of L-glutamate. *Anal Lett* 1991, 24:8:1445-1452.
- [5]. Ghobadi S, Csöregi E, Marko-Varga G, Gorton L: Bienzyme carbon paste electrodes for L-glutamate determination. *Current Separations* 1996, 14:3/4:94-102.
- [6]. Suleiman AA, Villarte RL, Guilbault GG: Analytical applications of glutamate oxidase based amperometric electrodes. *Bull Electro-chem* 1992, 8:4:189-192.
- [7]. Almeida NF, Mulchandani AK: A mediated amperometric enzyme electrode using tetrathiafulvalene and L-glutamate oxidase for the determination of L-glutamic acid. *Anal Chim Acta* 1993, 282:2:353-361.
- [8]. Herbreteau B, Lafosse M, Morin-Alloiry L, Dreux M: Automatic sugar analysis in the beet industry. Part I: Parameter optimization of a reversed phase HPLC carbohydrate determination. *Journal of Separation Science*. 1990, 13:4:239-243.
- [9]. Vercellotti SV, Clarke MA: Comparison of modern and traditional methods of sugar

analysis International Sugar Journal 1994, 96: 437-445.

[10]. Murachi T, Tabata M: Use of a bioreactor consisting of a sequentially aligned L-glutamate dehydrogenase and L-glutamate oxidase for the determination of ammonia by chemiluminescence. *Biotechnol Appl Biochem* 1987, 9:4:303-309.

[11]. Soldatkin AP, Dzyadevych SV, Korpan YI, Sergeyeva TA, Arkhypova VN, Biloivan OA, Soldatkin OO, Shkotova LV, Zinchenko OA, Peshkova VM, Saiapina, OY, Marchenko SV, El'skaya AV: Biosensors. A quarter of a century of R&D experience. *Biopolymers and Cell* 2013, 29:3:188-206.

[12]. White SF, Turner APF, Bilitewski U, Schmid RD, Bradley J: Lactate, glutamate and glutamine biosensors based on rhodinized carbon electrodes *Analytica Chimica Acta* 1994, 295: 243-251.

[13]. Wollenberger U, Scheller FW, Hintsche R, Bohm K: Verfahren zur amperometrischen bestimmung von L-glutamat. *Pat DD 272 478 A1*; 1989.

[14]. Zilkha E, Koshy A, Obrenovitch TP, Bennetto HP, Symon L: Am-perometric biosensors for online monitoring of extracellular glucose and glutamate in the brain. *Anal Lett* 1994, 27:3: 453-473.

[15]. Li Q, Zhang S, Yu J: Immobilization of L-glutamate oxidase and peroxidase for glutamate determination in flow injection analysis system. *Appl Biochem Biotechnol* 1996, 59:1:53-61.

[16]. Chen RLC, Matsumoto K: Sequential enzymatic monitoring of glucose, ethanol and glutamate in bioreactor fermentation broth containing a high salt concentration by a multichannel flow-injection analysis method. *Anal Chim Acta* 1995, 309:145-151.

[17]. Kirdeciler SK, Soy E, Ozturk S, Kucherenko I, Soldatkin O, Dzyadevych S, Akata B: A novel urea conductometric biosensor based on zeolite immobilized urease. *Talanta* 2011, 85:1435-1441.

[18]. Saiapina OY, Pyeshkova VM, Soldatkin OO, Melnik VG, Kurc BA, Walcarius A, Dzyadevych SV, Jaffrezic-Renault N:

Conductometric enzyme biosensors based on natural zeolite clinoptilolite for urea determination, *Mater. Sci. Eng., C*, 2011, 31:1490-1497.

[19]. Kucherenko IS, Soldatkin OO, Kasap B, Öztürk S, Akata B, Soldatkin AP, Dzyadevych SV: Elaboration of urease adsorption on silicalite for biosensor creation. *Electroanalysis* 2012, 24:1380-1385.

[20]. Velychko TP, Soldatkin OO, Melnyk VG, Marchenko SV, Kirdeciler SK, Akata B, Soldatkin AP, El'skaya AV, Dzyadevych SV: A novel conductometric urea biosensor with improved analytical characteristic based on recombinant urease adsorbed on nanoparticle of silicalite *Nanoscale Research Letters* 2016, 11:106.

[21]. Kucherenko I, Soldatkin O, Ozansoy Kasap B, Kirdeciler SK, Akata Kurc B, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin A, Lagarde F, Dzyadevych S: Nanosized zeolites as a perspective material for conductometric biosensors creation *Nanoscale Research Letters* 2015, 10:209.

[22]. Soy E, Arkhypova V, Soldatkin O, Shelyakina M, Dzyadevych S, Warzywoda J, Sacco Jr. A, Akata B: Investigation of characteristics of urea and butyrylcholine chloride biosensors based on ion-selective field-effect transistors modified by the incorporation of heat-treated zeolite Beta crystals *Materials Science and Engineering: C*, 2012, 32:1835-1842.

[23]. Soldatkin OO, Kucherenko IS, Shelyakina M, Soy E, Kirdeciler K, Öztürk S, Akata B, Jaffrezic-Renault N, Dzyadevych SV, Soldatkin AP: Application of different zeolite for improvement of the characteristics of a pH-FET biosensor based on immobilized urease. *Electroanalysis* 2013, 25:2:468-474

[24]. Soldatkin OO, Soy E, Errachid A, Jaffrezic-Renault N, Akata B, Soldatkin AP, Dzyadevych SV: Influence of composition of zeolite/enzyme nanobiocomposites on analytical characteristics of urea biosensor based on ion-selective field-effect transistors. *Sensor Lett.* 2011, 9:2320-2326.

[25]. Shelyakina MK, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Kasap BO, Akata B, Dzyadevych SV: Study of zeolite influence on analytical

characteristics of urea biosensor based on ion-selective field-effect transistors. *Nanoscale Res Lett.* 2014, 9:124.

[26]. Soldatkin OO, Shelyakina MK, Arkhypova VN, Soy E, Kirdeciler SK, Ozansoy Kasap B, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Akata Kurç B, Soldatkin AP, Dzyadevych SV: Nano- and micro-sized zeolites as a perspective material for

potentiometric biosensors creation. *Nanoscale Research Letters* 2015, 10:59.

[27]. Soldatkin OO, Ozansoy Kasap B, Akata Kurç B, Soldatkin AP, Dzyadevych SV, El'skaya AV: Elaboration of new method of enzyme adsorption on silicalite and nano beta zeolite for amperometric biosensor creation. *Biopolymers and Cell* 2014, 30:4:291–298.

Стаття надійшла до редакції 11.09.2025 р.

UDC 543.9, 543.553.8, 577.15.08

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.3.339804>

DEVELOPMENT OF AN AMPEROMETRIC GLUTAMATE-SENSITIVE BIOSENSOR BASED ON GLUTAMATE OXIDASE ADSORBED ON SILICALITE

O. V. Soldatkina¹, D. O. Mruga¹, D. Yu. Kucherenko¹, I. S. Kucherenko¹, O. O. Soldatkin^{1,2}, B. Akata Kurç^{3,4}, S. V. Dzyadevych^{1,2}

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine,
150 Zabolotnogo St, Kyiv, 03143, Ukraine

²Institute of High Technologies, Taras Shevchenko National University of Kyiv,
64, Volodymyrska St, Kyiv, 01003, Ukraine

³Middle East Technical University, Micro and Nanotechnology Department,
Ankara, 06531, Turkey

⁴Middle East Technical University, Central Laboratory,
Ankara, 06531, Turkey

e-mail: olgasoldatkina@yahoo.com; alex_sold@yahoo.com; didukh.d@gmail.com;
kucherenko.i.s@gmail.com; darynamruga@gmail.com; akata@metu.edu.tr; dzyad@yahoo.com

Abstract. In the current work, a new design of an amperometric biosensor for highly sensitive and selective detection of glutamate was developed using an atypical method of immobilizing glutamate oxidase (GLOX) by adsorption onto silicalite nanoparticles. The procedure for manufacturing the biosensor was optimized, namely, the main parameters of the modification of amperometric platinum transducers with a layer of silicalite nanoparticles were determined, and the optimal conditions for GLOX adsorption on this layer were also selected.

Biosensors based on GLOX adsorbed on silicalite demonstrated high sensitivity to low concentrations of glutamate. The linear detection range was from 2.5 μM to 450 μM , and the detection limit of glutamate was 1 μM . It was also shown in the work that the proposed biosensors are characterized by high reproducibility of responses during several hours of continuous operation (RSD up to 7%) and good operational stability for several days.

After carrying out the entire complex of works on the development and optimization of a new glutamate-sensitive biosensor, it was found that sensors of this design with the declared analytical characteristics can be used to determine low concentrations of glutamate in real biological fluids.

Keywords: silicalite; enzyme; biosensor; glutamate oxidase; amperometry; glutamate