

УДК 577.15 + 543.6 + 543.9 + 543.55

НОВИЙ АМПЕРОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ ГЛІЦЕРОЛОКСИДАЗИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГЛІЦЕРОЛУ

Горюшкіна Т. В.^{1,2}

Шкотова Л. В.¹

Гайда Г. З.³

Клепач Г. М.^{3,4}

Гончар М. В.³

Солдаткін О. П.¹

Дзядевич С. В.¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка

³Інститут біології клітини НАН України, Львів

⁴Дрогобицький державний педагогічний університет ім. Івана Франка

E-mail: dzyad@yahoo.com

Проведено порівняльний аналіз ефективності використання різних за способом одержання та характеристиками препаратів гліцеролоксидази для створення амперометричного біосенсора, призначеного для визначення вмісту гліцеролу. Вибрано препарат ферменту, після іммобілізації якого на поверхню перетворювача сенсор демонструє найкращі аналітичні характеристики. Визначено рН-оптимум роботи амперометричного біосенсора, показано, що величина буферної ємності та концентрація фонового електроліту не впливають на його роботу. За допомогою створеного амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої гліцеролоксидази здійснено аналіз гліцеролу у модельних розчинах.

Ключові слова: амперометричний біосенсор, гліцеролоксидаза, гліцерол, іммобілізація, електрохімічна полімеризація.

Гліцерол є одним із метаболітів спиртового бродіння, його широко використовують у виробництві та фармакології. Ще в 1857 році Л. Пастер у своїх класичних дослідженнях алкогольного бродіння показав, що крім головних продуктів бродіння — спирту та вуглекислоти — утворюються побічні продукти, у тому числі й гліцерол (2,5–3,6 г на 100 г зброженого цукру) [1]. Велика кількість гліцеролу утворюється у процесі бродіння сусла в присутності бісульфіту натрію. У цьому разі оцтовий альдегід, який зазвичай є акцептором водню, зв'язується бісульфітом, а його місце у ланцюгу перетворень займають діоксіацетофосфат та 3-фосфогліцероловий альдегід; вони отримують водень від відновленого коферменту НАД·Н₂, утворюючи 1-гліцерофосфат, який у результаті дефосфорилування перетворюється на гліцерол. Таке бродіння називається гліцеропіруватним і має найбільшу інтенсивність у перші фази процесу бродіння. Воно відіграє важливу роль у синтезі багатьох вторинних продуктів, які впливають на якість вина [1]. Гліцерол також утворюється в тому разі, якщо бродіння сусла відбувається в лужному середовищі.

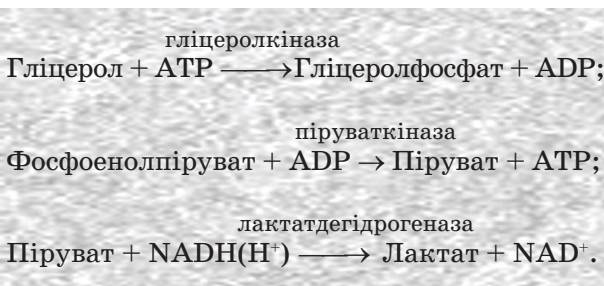
Визначення концентрації гліцеролу має особливо велике значення у виноробстві. Необхідність і важливість детекції цього продукту бродіння можна пояснити тим, що з усіх компонентів вина кількісно він поступається лише етиловому спирту. Загальна кількість гліцеролу, яка формується упродовж процесу ферментації сусла, становить від 1:10 до 1:15 кількості спирту з кінцевою концентрацією від 1 до 10 г/л [2]. Вагому роль гліцерол відіграє у формуванні смаку вин, наданні їм маслянистості та м'якості [2–4]. Саме тому точні відомості про наявність та концентрацію гліцеролу в алкогольних напоях є важливим показником їхньої якості.

Визначення вмісту гліцеролу є також важливим у клінічній діагностиці для контролю рівня триацилгліцеридів у крові, оскільки моніторинг цих сполук має прогностичне значення для зменшення ризику захворювань серцево-судинної системи [5].

Сучасні стандартні методи визначення гліцеролу, такі як рідинна хроматографія та спектрофотометричні підходи на основі хімічних і ферментативних реакцій, зокрема оксидазно-пероксидазний метод [6, 7], потребують

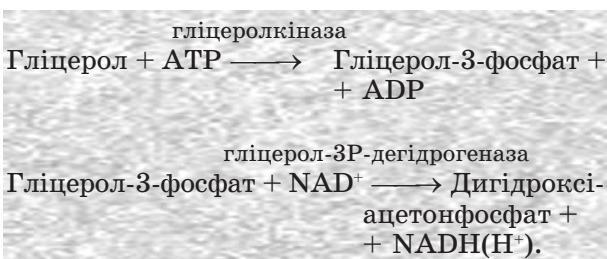
наявності кваліфікованого персоналу, складного й дорогого обладнання, необхідного для проведення рідинної хроматографії та спектрофотометрії. Ще одним недоліком зазначених методів є потреба у досить складній попередній підготовці проб для аналізу.

Відомі фірми Boehringer Mannheim (Німеччина) та Sigma (США) пропонують тест-набори для ферментативного аналізу гліцеролу. Висока вартість наборів часто зумовлена необхідністю використання кількох ферментів та коферментів або косубстратів. Наприклад, мультиферментна система [8] включає три ферменти — гліцеролкіназу, піруваткіназу та лактатдегідрогеназу, а також потребує присутності коферменту — NADH і двох косубстратів — ATP та фосфоенолпірувату:

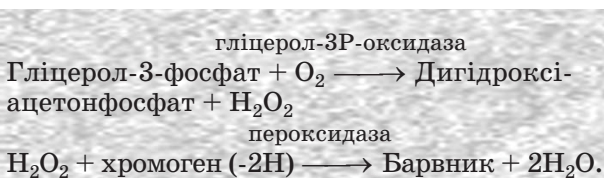


За цим методом концентрацію гліцеролу визначають за зменшенням кількості спожитого NADH, який реєструють фотометрично при довжині хвилі 340 нм.

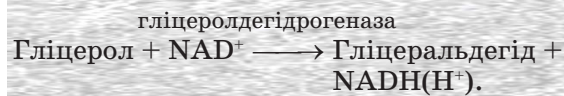
Іншим методом для визначення вмісту гліцеролу є двоферментний, у першому варіанті якого використовують гліцеролкіназу і гліцерол-3-фосфатдегідрогеназу, а моніторинг реакції здійснюють за утворенням NADH(H⁺) при 340 нм:



У другому варіанті двоферментного методу гліцерол-3-фосфатдегідрогеназна реакція замінена на гліцерол-3-фосфатоксидазну, що покладено в основу діагностичного набору для визначення гліцеролу:



Третій метод для визначення вмісту гліцеролу — дегідрогеназний — ґрунтується на визначенні кількості NADH(H⁺), генерованого в результаті ферментативної реакції, каталізованої гліцеролдегідрогеназою:



Використання цього методу в аналітичній практиці є ускладненим, оскільки реакція окиснення гліцеролу гліцеролдегідрогеназою є оборотною, а фермент — недостатньо селективний.

Традиційні ферментативні підходи для визначення гліцеролу недостатньо селективні, як і в разі дегідрогеназних реакцій, або неекономічні у повсякденному використанні їх в лабораторії. З огляду на це сьогодні є актуальним питання створення більш зручного, точного, селективного, швидкого та дешевого методу визначення вмісту гліцеролу в різноманітних харчових продуктах.

Розроблення та створення ферментних біосенсорів для визначення вмісту гліцеролу може вирішити проблеми, пов'язані з переліченими вище недоліками, та задовольнити усім вищезазначеним вимогам. Головна перевага біосенсорів — висока специфічність, швидкість отримання результатів, легкість оброблення даних та низька собівартість аналізу.

На цей час розроблено й досліджено чимало біосенсорів, призначених для детекції гліцеролу. Їх було створено на основі ферментів гліцеролдегідрогенази [4, 9] та гліцеролкінази, коімобілізованої з гліцерол-3-фосфатоксидазою [2]. В останньому випадку головним недоліком створеного біосенсора була його низька стабільність: після трьох днів зберігання в робочому буфері залишалось 10% активності ферментів. У разі використання гліцеролдегідрогенази істотним недоліком біосенсора, який суттєво підвищує собівартість аналізу, є те, що цей фермент не містить у своєму складі кофактору (НАД), а тому його потрібно вводити в систему додатково. При цьому НАД може легко дифундувати з ферментативної мембрани, спричинюючи значне зниження чутливості біосенсора [9].

Створення амперометричного біосенсора на основі гліцеролоксидази (ГО) може стати гідною уваги альтернативою вищезазначеним датчикам, адже цей фермент уже містить у своїй структурі природний кофактор — ФАД.

На сьогодні на ринку ферментів ГО відсутня, а відтак актуальною проблемою залишається пошук продуцентів ГО і розроблення ефективних методів очищення цього ферменту. ГО виявлена у низки плісневих грибів роду *Aspergillus*, *Penicillium* [10], *Neurospora* [11], *Botrytis* [12], а також актиноміцетів. У високоочищеному стані фермент виділено тільки із трьох видів — *Aspergillus japonicus* [5], *Penicillium* sp. [13] і *Botrytis allii* [14]. У попередніх дослідженнях нами було проведено скринінг серед потенційних продуцентів ГО — штамів плісневих грибів, обрано джерело ферменту — гриб *B. allii* 100(5), визначено оптимальні умови культивування клітин продуцента для забезпечення максимального синтезу ГО [15], розроблено методи отримання безклітинних екстрактів і схеми виділення та очищення ферменту, запропоновано способи стабілізації препаратів ГО та показано можливість біоаналітичного використання ферменту [20].

Метою даної роботи було розроблення амперометричного біосенсора на основі платинового друкованого електрода SensLab (SensLab GmbH, Leipzig, Німеччина) з іммобілізованою ГО та оптимізація його робочих характеристик.

Матеріали і методи

У роботі використовували препарати ГО, одержані з плісневого гриба *B. allii*, штам 100 (5) [15]. Клітини гриба вирощували 3 доби в колбах об'ємом 500 мл при 28 °С на шейкері за постійної аерації (200 об/хв) на середовищі з рН 3,0–3,5 такого складу, г/л: KNO_3 — 3,5, KH_2PO_4 — 3, NaCl — 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, CaCl_2 — 0,03, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 0,001, гліцерол 60, меляса — 2 (компоненти середовища розчиняли у водопровідній воді); клітини гриба відмивали водою, ресуспендували у 50 мМ боратному буфері (ББ), рН 9,18, заморожували і зберігали при –20 °С. Для отримання безклітинного екстракту (БЕ) міцелій гриба руйнували механічним розтиранням у ступці, з охолодженням, у присутності інгібіторів протеаз — 2 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА), 0,5 мМ фенілметилсульфонілфториду, 0,1 мМ *m*-амінофенілборної кислоти та 10 мкМ лейпептину. БЕ відокремлювали від уламків клітин центрифугуванням (15 000 об/хв, $r_{\text{сеп}}=8$ см, 30 хв, 4 °С), визначали активність [15] та концентрацію білка за Лоурі.

Первинне очищення ГО із БЕ проводили за схемами А або К.

Схема А — фракціонування ацетоном. До БЕ (питома активність ГО — 0,16–0,2 мкмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка) додавали охолоджений (–25 °С) ацетон до 10 %, інкубували 30 хв при –10 °С, центрифугували (15 000 об/хв, $r_{\text{сеп}} = 8$ см, 30 хв, –10 °С). Осад відкидали, до супернатанту додавали порцію (1:1) ацетону — до 55 %, інкубували 30 хв при –10 °С, осад збирали центрифугуванням, суспендували у ББ. Суспензію освітлювали центрифугуванням, осад відкидали. Екстракт 55%-го осаду містив ГО.

Схема К — колонкова хроматографія. БЕ наносили на колонку з бацитрацин-сिलохромом, зрівноважену ББ, з інгібіторами протеаз, промивали сорбент 3-кратним об'ємом буфера ББ. Проскок і промивні розчини містили ГО.

Хроматографічне очищення ферменту на аніонообмінному сорбенті. Розчини, що містили первинноочищені препарати ГО з питомою активністю 0,25–0,5 мкмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка, наносили на колонку з аніонітним сорбентом целюлозної природи — DEAE-Toyoparl 650 М (TSK-Gel, Японія), зрівноважену ББ. ГО елюювали 0,2–1М NaCl або 20%-м (від насичення, при 0 °С) розчином сульфату амонію у вихідному ББ, у кожній фракції визначали питому активність ГО. Фракції елюатів, у яких активність ГО була вищою за 1,5 мкмоль·хв⁻¹·мг⁻¹ білка, об'єднували. Фермент концентрували і додатково очищували осадженням сульфатом амонію до 70% (від насичення, при 0 °С). Осад збирали центрифугуванням, розчиняли в мінімальному об'ємі ББ, визначали активність ГО і каталази [15]. До препаратів ГО додавали різні стабілізуювальні добавки і зберігали при 0 °С.

Як полімерну матрицю для електрохімічного нанесення ферменту використовували мономер 3,4-етилендіокситіофен (ЕДТ) виробництва фірми Baytron M (Німеччина) та поліетиленгліколь ММ=1450 фірми Sigma (США).

Також у роботі застосовували реагенти: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , KCl, NaOH та гліцерол вітчизняного виробництва. Усі реактиви, як вітчизняного, так й імпортного виробництва, були кваліфікації «ос. ч.» і «х. ч.».

Вимірювання. Усі електрохімічні експерименти було виконано за допомогою традиційної триелектродної системи, в якій друкований електрод SensLab (SensLab GmbH, Leipzig, Німеччина) об'єднував у собі всі три електроди: платиновий робочий, допоміжний та електрод порівняння [16].

Платинові друковані електроди SensLab досліджували на відтворюваність та працездатність у діапазоні потенціалу від 0 до +300 мВ (швидкість розгортання потенціалу становила 20 мВ/с). Циклічну вольтамперометрію було виконано на потенціостаті ПІ-50-11 (Україна).

Амперометричне вимірювання при постійному потенціалі проводили в електрохімічній комірці об'ємом 5 мл за допомогою потенціостата ПІ-50-11(Україна) та програматора ПР-8 (Україна).

Імобілізація ГО електрохімічною полімеризацією у полі-(3,4-етилендіокситіофені) (ПЕДТ). Процес електрохімічної полімеризації становить особливий інтерес, оскільки є технологічно зручним. Він дозволяє вибирати і підтримувати розмір, форму й товщину матриці та забезпечує чіткий контроль за процесом осадження [17].

ПЕДТ належить до родини політіофенів — електропровідних полімерів з відносно новими та досить цікавими властивостями. Виконані з ними дослідження [18] демонстрували слабку провідність, невелику зміну заряду, підвищену стабільність і дуже добру здатність до формування плівки. ЕДТ є комерційним продуктом фірми Baytron, який нещодавно надійшов на ринок від фірми Bayer AG (Німеччина).

Гомогенна плівка ПЕДТ фіксується на поверхні робочого електрода, заполімеризованого електрохімічно ЕДТ, за умов нейтрального рН та температури. Формування плівки відбувається краще у водних та, якщо є можливість, гідрофільних полімерах типу полівінілпіролідон (ПВП) чи поліетиленгліколь (ПЕГ), розчинених у воді з електрополімеризуючим розчином. При цьому підвищується гідрофільність полімеру, що наноситься. Окиснення та відновлення залежать від прикладеного потенціалу, який контролює формування позитивного заряду в структурі полімеру. Для ПЕДТ є докази, що поліаніони як олігонуклеотиди можуть бути ефективно утримані у полімерній сітці, що працює за слабкої іонної сили [19].

Для електрохімічної полімеризації в роботі використовували суміш компонентів, приготованих у 20 мМ фосфатному буфері з рН 6,2, яка складалася з 10^{-2} М 3,4-етилендіокситіофену, 10^{-3} М поліетиленгліколю та розчину ГО.

Полімеризацію ЕДТ здійснювали, прикладаючи потенціал від +0,2 В до +1,5 В зі швидкістю 0,1 В/с протягом 15 циклів.

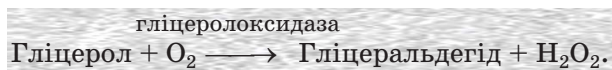
Визначення гліцеролу у модельних розчинах. Вимірювання проводили у 100 мМ К,

Na-фосфатному буферному розчині, рН 7,2, при кімнатній температурі у відкритій місткості за інтенсивного перемішування. Концентрації субстратів змінювали, додаючи певні аліквоти концентрованих розчинів.

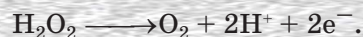
Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали буферним розчином до стабілізації базового сигналу.

Результати та обговорення

В основі роботи амперометричної системи для визначення вмісту гліцеролу лежить ферментативна реакція:



Процес ферментативного перетворення гліцеролу супроводжується утворенням електрохімічно активної речовини — пероксиду водню, який окиснюється з утворенням електронів, які, у свою чергу, можна реєструвати за допомогою амперометричного перетворювача:



Відсутність комерційного препарату ферменту спонукала виділити ГО з обраного штаму-продуцента плісеневого гриба *B. allii* [штам 100(5)] [15]. Запропоновані схеми виділення та очищення ферменту із безклітинного екстракту гриба, які включали стадію первинного очищення ГО за схемами А (фракціонування ацетоном) або К (колонкова хроматографія) з наступним хроматографічним очищенням ферменту на аніонообмінному сорбенті, дозволили одержати препарати ГО з питомою активністю до $5,7 \text{ мкмоль} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка, тобто очистити фермент у 30 разів [20]. Було доведено стабілізуючий вплив іонів Mn^{2+} (5–10 мМ), Ca^{2+} (1–2 мМ), сульфату амонію (20–70% від насичення при 0 °С), 1 мМ ЕДТА, сахарози (50%) та поліетиленіміну (ПЕІ) (0,05%) на активність ГО у розчині, тому саме ці сполуки додавали до очищених препаратів ГО, які було використано для імобілізації на електродах у процесі створення гліцеролселективного біосенсора (табл. 1).

На першому етапі роботи з конструювання біосенсора на поверхню амперометричного перетворювача було імобілізовано всі одержані препарати ГО. У ході порівняльного аналізу біосенсорів досліджували їхні діпазони роботи, граничні концентрації гліцеролу, що визначаються сенсором, а також їхню стабільність під час зберігання (табл. 2).

Таблиця 1. Характеристика препаратів гліцеролоксидази, які було досліджено у процесі створення біосенсорів для визначення гліцеролу

№ препарату	Схема первинного очищення	Характеристика препаратів ГО				Кількість ГО у біомембрані	
		Активність		Стабілізуювальні добавки у 50 мМ ВБ, рН 9,18	Домішки каталази	мкг	од. 10 ⁻³
		відносна, од./мл	питома, од./мг				
1	А	1,4	1,4	70% СА; 5 мМ MnCl ₂ ; 1 мМ ЕДТА; 0,05% ПЕІ	–	0,84	4,2
2	А	0,8	5,7	70% СА; 1 мМ CaCl ₂ ; 1 мМ ЕДТА; 0,05% ПЕІ	–	0,42	2,4
3	А	1,0	2,0	70% СА; 1 мМ CaCl ₂ ; 0,05% ПЕІ	+	1,5	3,0
4	К	1,5	1,7	1 М NaCl; 1 мМ MnCl ₂	–	2,7	4,6
5	К	1,0	2,0	0,3 М NaCl; 1 мМ CaCl ₂ ; 0,05% ПЕІ	–	1,5	3,0
6	А	0,3	3,0	1 М NaCl; 1 мМ MnCl ₂ ; 50% сахароза	–	0,3	0,9
7	К	1,6	2,5	70% СА; 5 мМ MnCl ₂ ; 0,05% ПЕІ	–	2,0	4,9
8	К	0,9	1,5	70% СА; 5 мМ MnCl ₂ ; 0,05% ПЕІ	+	1,8	2,7
9	К	1,3	1,8	70% СА; 5 мМ MnCl ₂ ; 0,05% ПЕІ	+	2,2	3,9

Примітка. СА — сульфат амонію; ПЕІ — поліетиленімін; ЕДТА — етилендіамінтетраоцтова кислота.

Таблиця 2. Порівняльний аналіз лабораторних прототипів амперометричних біосенсорів, створених на основі різних препаратів гліцеролоксидази

№ препарату ГО	Активність при іммобілізації у чутливу мембрану	Мінімальна детектована концентрація гліцеролу	Лінійний діапазон роботи сенсора	Стабільність сенсора під час зберігання
1	+	0,05 мМ	0,05–25,6 мМ	75% активності через 15 діб, 14% — через 40 діб
2	–	–	–	–
3	+	0,002 мМ	0,002–6,4 мМ	30% активності через 4 доби
4	Низький сигнал	0,002 мМ	0,002–0,05 мМ	10% активності через 3 доби
5	–	–	–	–
6	–	–	–	–
7	–	–	–	–
8	+	0,2 мМ, з часом 0,8 мМ	0,2–25,6 мМ	10% активності через 5 діб
9	+	0,2 мМ	0,2–25,6 мМ	10% активності через одну добу

На рис. 1 наведено калібрувальні криві лабораторних прототипів амперометричних біосенсорів, одержаних на основі різних препаратів ГО.

Виходячи з отриманих результатів, для подальшої роботи було обрано препарат ГО №1, який характеризувався лінійною залежністю величини відгуку біосенсора від концентрації гліцеролу в діапазоні 0,05–25,6 мМ, мінімальною концентрацією гліцеролу, що визначається, — 0,05 мМ та кращою стабільністю порівняно з іншими препаратами.

На рис. 2 зображено відгуки амперометричного біосенсора на послідовне внесення

гліцеролу в експериментальну комірку. Форма відгуків була типовою для ферментних біосенсорів. Окрім того, з рисунка видно, що величини відгуків на додавання однакових кількостей гліцеролу були теж однакові.

На подальшому етапі роботи було визначено рН-оптимум роботи амперометричного біосенсора з іммобілізованою ГО №1. Оптимум роботи амперометричного біосенсора з ГО, іммобілізованою у ПЕДТ, спостерігається при рН 7,2 (рис. 3). Отримані результати добре корелюють з даними літератури, згідно з якими рН-оптимум роботи ГО у розчині становить близько 7,0 [13, 21].

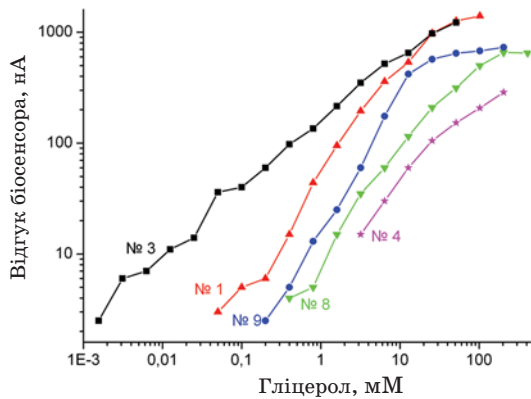


Рис. 1. Калібрувальні криві лабораторних прототипів амперометричних біосенсорів, одержаних електрохімічною полімеризацією у ПЕДТ на основі різних препаратів гліцеролоксидази. Вимірювання проводили у 100 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, потенціал +300 мВ відносно внутрішнього електроду порівняння

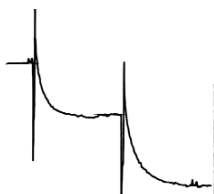


Рис. 2. Відгук амперометричного біосенсора з іммобілізованою електрохімічною полімеризацією у ПЕДТ гліцеролоксидазою на 25,6 та 51,2 мМ гліцеролу

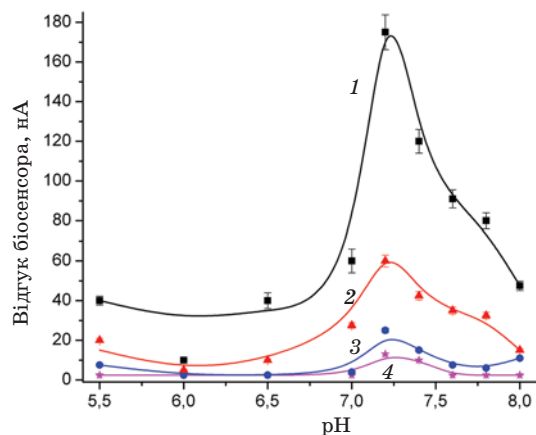


Рис. 3. Залежність величини відгуку амперометричного біосенсора на основі гліцеролоксидази, іммобілізованої у ПЕДТ електрохімічним нанесенням, від рН розчину.

Вимірювання проводили у 100 мМ фосфатному буфері, потенціал +300 мВ відносно електроду порівняння. Концентрація гліцеролу в комірі: 3,2 мМ (1); 1,6 мМ (2); 0,8 мМ (3); 0,4 мМ (4)

Дослідження впливу концентрації фонового електроліту в буфері та буферної ємності на роботу амперометричного біосенсора показало, що їх зміна істотно не впливає на величину відгуку (рис. 4, 5). Це є типовою ситуацією для ферментних амперометричних біосенсорів.

Було вивчено стабільність амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої гліцеролоксидази і встановлено, що величина відгуку

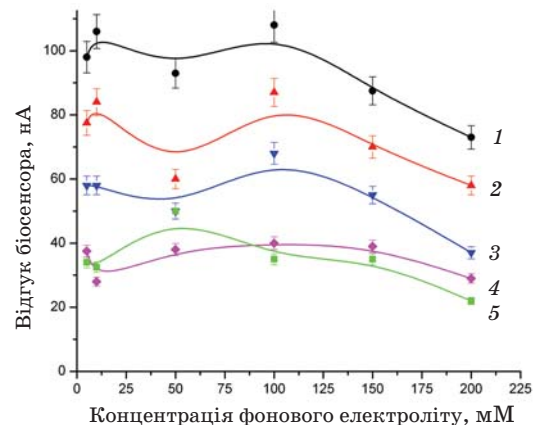


Рис. 4. Залежність величини відгуку амперометричного біосенсора на основі гліцеролоксидази, іммобілізованої у ПЕДТ електрохімічним нанесенням, від концентрації фонового електроліту в буфері. Вимірювання проводили у 100 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, потенціал +300 мВ відносно електроду порівняння. Концентрація гліцеролу в комірі: 6,4 мМ (1); 3,2 мМ (2); 1,6 мМ (3); 0,8 мМ (4); 0,4 мМ (5)

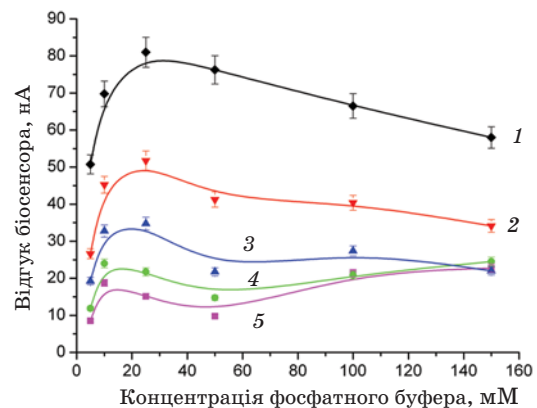


Рис. 5. Залежність величини відгуку амперометричного біосенсора на основі гліцеролоксидази, іммобілізованої у ПЕДТ електрохімічним нанесенням, від концентрації буферного розчину. Концентрація гліцеролу в комірі: 1,6 мМ (1); 0,8 мМ (2); 0,4 мМ (3); 0,2 мМ (4); 0,1 мМ (5)

сенсора знижується в середньому на 2,5% за добу, а після 50 днів зберігання сенсора відгук на додавання гліцеролу був майже відсутній (рис. 6).

Таким чином, здійснено порівняльний аналіз ефективності використання різних за способом одержання та характеристиками препаратів ГО з метою створення амперометричного біосенсора для визначення вмісту гліцеролу. Встановлено, що біосенсор на основі препарату ГО №1 (схема первинного очищення А, питома активність — 5 од./мг, стабілізуювальні добавки — 70%-й сульфат амонію; 5 мМ $MnCl_2$; 1 мМ ЕДТА; 0,05%-й поліетиленімін у 50 мМ боратному буфері, рН 9,18) демонструє найкращі робочі характеристики — лінійний діапазон у межах

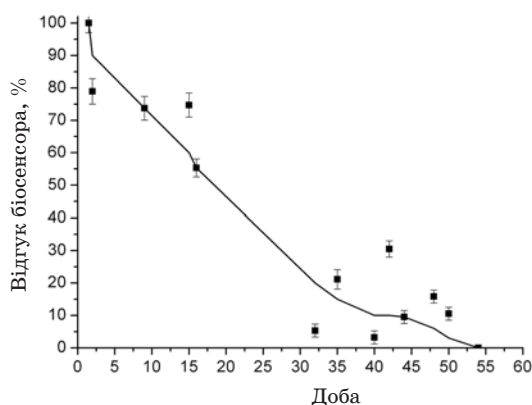


Рис. 6. Стабільність амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої електрохімічною полімеризацією гліцеролоксидази у ПЕДТ. Вимірювання проводили у 100 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, потенціал +300 мВ відносно внутрішнього електроду порівняння

ЛІТЕРАТУРА

1. Родопуло А. К. Биохимия виноделия. — М.: Пищевая промышленность, 1971.
2. Compagnone D., Esti M., Messia M. C. et al. Development of a biosensor for monitoring of glycerol during alcoholic fermentation // Biosensors Bioelectron. — 1998. — V.13. — P. 875–880.
3. Жулякова Т. А., Гержикова В. Г., Семенчук В. А. Исследование динамики накопления глицерина в ходе брожения виноградного суслу // Виноградарство и виноделие. — 2003. — Т. 3. — С. 18–21.
4. Kiba N., Azuma N., Furusawa M. Chemiluminescent method for the determination of glycerol in wine by flow-injection analysis with co-immobilized glycerol dehydrogenase/NADH oxidase // Talanta. — 1996. — V.43. — P. 1761–1766.
5. Uwajima T., Shimizu Y., Terada O. Glycerol oxidase, a novel copper hemoprotein from *Aspergillus japonicus*. Molecular and catalytic properties of the enzyme and its application to the analysis of serum triglycerides // J. Biol. Chem. — 1984. — V. 259. — P. 2748–2753.
6. А.с. № 1636773 СССР, МКИ⁵ G 01 N 33/52. Способ определения пероксидазной активности биологических объектов / М. В. Гончар, А. А. Сибирный (СССР). — № 4363857/14; Заявл. 13.01.88; Оpubл. 23.03.91, Бюл. № 11. — 6 с.
7. Гончар М. В. Чутливий метод кількісного визначення пероксиду водню та субстратів оксидаз у біологічних об'єктах // Укр. біохім. журн. — 1998. — Т. 70, № 5. — С. 157–163.

0,05–25,6 мМ гліцеролу і мінімальну концентрацію гліцеролу, що визначається, — 0,05 мМ, та зберігає 75% своєї активності через 15 діб після іммобілізації у чутливу мембрану.

Визначено рН-оптимум роботи створеного амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої електрохімічною полімеризацією ГО у ПЕДТ, який становить 7,2. Показано, що величина буферної ємності та концентрації фонового електроліту в буфері не впливає на роботу біосенсора. За допомогою створеного амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої ГО проведено аналіз концентрації гліцеролу в модельних розчинах.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб».

8. West S. I. Analytical enzymes: diagnostics. — London: Macmillan Press Ltd., 1998. — P. 63–68.
9. Laurinavicius V., Kurtinaitiene B., Gureviciene V. et al. Amperometric glyceride biosensor // Anal. Chim. Acta. — 1996. — V. 330. — P. 159–166.
10. Uwajima T., Akita H., Ito K. et al. Some characteristics of new enzyme «Glycerol Oxidase» // Agric. Biol. Chem. — 1979. — V. 43. — P. 2633–2634.
11. Hill P., Martin S. M. Cellular proteolytic enzymes of *Neurospora crassa*. Purification and some properties of five intracellular proteinases // Eur. J. Biochem. — 1975. — V. 56, N1. — P. 271–281.
12. Куплетская М. Б., Лухачев А. Н. Глицериноксидазная активность грибов рода *Botrytis micheli* // Микология и фитопатология. — 1996. — Т. 30, Вып. 5–6. — С. 55–58.
13. Lin S. F., Chiou C. M., Tsai Y. C. Purification and characterization of a glycerol oxidase from *Penicillium sp.* TS-622 // J. Enzyme Microb. Technol. — 1996. — V. 18. — P. 383–387.
14. Пат. 2117702С1 Россия, МПК⁶ C12N 9/04/(C12N9/04, C12R1:645). Способ получения глицеролоксидазы /ООО «Импакт» (Россия). — № 95115005/13; Заявл. 22.08.95; Оpubл. 20.08.98.
15. Павлішко Г., Гайда Г., Гончар М. Скринінг штамів продуцентів, очищення та первинна характеристика гліцеролоксидази із плісневих грибів // Вісник Львів. ун-ту. — Сер. Біол. — 2004. — Вып. 38. — С. 67–73.
16. Шкотова Л. В., Слатья Е. А., Жулякова Т. А. та ін. Амперометричний біосенсор

- для аналізу етанолу у вині та у виноградному суслі в процесі його ферментації // Укр. біохім. журн. — 2005. — Т. 77, №1. — С. 96–103.
17. Шкотова Л. В., Горюшкіна Т. Б., Слатьє Е. А. та ін. Амперометричний біосенсор для аналізу лактату у вині та у виноградному суслі у процесі його ферментації // Там само. — 2005. — Т. 77, №5. — С. 123–130.
 18. Ghosh S., Rasmuson J., Inganas O. Supramolecular self-assembly for enhanced conductivity in conjugated polymer blends: ionic crosslinking in blends of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-Poly(styrenesulfonate) and Poly(vinylpyrrolidone) // Adv. Mater. — 1998. — V. 10, N14. — P. 1097–1099.
 19. Piro B., Pham M.-C., Ledoan T. Electrochemical method for entrapment of oligonucleotides in polymer-coated electrodes // J. Biom. Mat. Res. — 1999. — V. 46, N4. — P. 566–572.
 20. Гайда Г. З., Павлішко Г. М., Смуток О. В. та ін. Гліцеролоксидаза плісеневого гриба *Botrytis allii*: виділення, характеристика та біоаналітичне використання // Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій / За ред. акад. Г. В. Єльської, акад. В. Д. Походенка. — К.: Ін-т. мол. біології і генетики НАН України, 2006. — С. 5–12.
 21. Isobe K. Oxidation of ethylene glycol and glycolic acid by glycerol oxidase // Biosci. Biotechnol. Biochem. — 1995. — V. 59, N4. — P. 576–81.

НОВЫЙ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ ГЛИЦЕРОЛОК- СИДАЗЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ГЛИЦЕРОЛА

Т. Б. Горюшкіна^{1,2}, Л. В. Шкотова¹,
Г. З. Гайда³, Г. М. Клепач^{3,4}, М. В. Гончар³,
А. П. Солдаткін¹, С. В. Дзядевич¹

¹Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко

³Институт биологии клетки НАН Украины, Львов

⁴Дрогобычский государственный
педагогический университет им. Ивана Франко

E-mail: dzyad@yahoo.com

Проведен сравнительный анализ эффективности использования различных по способу получения и характеристикам препаратов глицеролоксидазы для создания амперометрического биосенсора для определения содержания глицерола. Выбран препарат фермента, после иммобилизации которого на поверхность преобразователя сенсор демонстрирует лучшие аналитические характеристики. Определен рН-оптимум работы биосенсора, показано, что величина буферной емкости и концентрация фонового электролита не влияют на его работу. С помощью созданного амперометрического биосенсора на основе иммобилизованной глицеролоксидазы осуществлен анализ глицерола в модельных растворах.

Ключевые слова: амперометрический биосенсор, глицеролоксидаза, глицерол, иммобилизация, электрохимическая полимеризация.

NOVEL AMPEROMETRIC BIOSENSOR BASED ON GLYCEROL OXIDASE FOR GLYCEROL DETERMINATION

T. B. Goriushkina^{1,2}, L. V. Shkotova¹,
G. Z. Gayda³, H. M. Klepach^{3,4},
M. V. Gonchar³, O. P. Soldatkin¹, S. V. Dzyadevych¹

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²Taras Shevchenko National University, Kyiv

³Institute of Cell Biology, of National Academy
of Sciences of Ukraine, L'viv

⁴Ivan Franko State Pedagogical University,
Drogobych

E-mail: dzyad@yahoo.com

The paper presents comparative effectiveness analysis of glycerol oxidase preparations, used for development of amperometric biosensor for glycerol determination, which are different in method of preparation and in characteristics. Enzyme preparation, whose immobilization on transducer surface results in sensor demonstrating its best operational characteristics, was selected. pH-optimum for the operation of the developed amperometric biosensor was determined; the values of buffer volume and background electrolyte concentration in buffer were shown to have no effect on the work of glycerol biosensor. The analysis of glycerol concentration in sample solutions was carried out using the developed amperometric biosensor based on glycerol oxidase.

Key word: amperometric biosensor, glycerol oxidase, glycerol, immobilization, electrochemical polymerization.