

## Разработка амперометрического ферментного биосенсора на основе углеродного волокна и иммобилизованной глюкозооксидазы

Л. В. Данилейко, О. Н. Шувайло, В. Н. Архипова, А. П. Солдаткин,  
С. В. Дзядевич

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

---

*Разработан глюкозный амперометрический биосенсор, изучены его характеристики и определены оптимальные условия для получения активной мембраны с глюкозооксидазой. Показано, что изменения концентрации фонового электролита и изменения буферной емкости незначительно влияют на величину отклика биосенсора, оптимум работы углеродного электрода с иммобилизованной глюкозооксидазой наблюдается при pH 7,2. Глюкозный микробиосенсор характеризуется линейной зависимостью величины отклика от концентрации глюкозы в диапазоне 0–8 мМ. Минимально определяемая с его помощью концентрация составляет 0,03 мМ. Разработанный биосенсор рекомендуется использовать в пищевой промышленности для контроля и оптимизации биотехнологических процессов.*

---

**Введение.** Контроль и оптимизация биотехнологических процессов в пищевой промышленности требуют быстрой и достоверной информации о концентрации субстратов и продуктов ферментативной реакции. Кроме того, всегда необходимы недорогие приборы по контролю за качеством полученных продуктов. Несмотря на то, что это очень старая проблема, все же ряд вопросов остается либо вообще не решенным, либо их решение связано с большими трудностями.

Чаще всего различные смеси компонентов, полученные в процессе ферментации, должны анализироваться одновременно, постоянно и, желательно, в реальном режиме времени. Обычно для этих целей применяют дорогостоящую аппаратуру (газовая и жидкостная хроматография, спектрометрия, масс- и ЯМР-спектроскопия), которую, с одной стороны, очень сложно ввести в технологический процесс, а, с другой, — она все равно не позволяет одновременно контролировать несколько параметров без сложных изменений и модификаций в ней самой. В связи с этим исследования

последних лет, направленные на разработку биосенсоров нового типа, показывают их высокий потенциал, в частности, для использования в пищевой промышленности [1, 2].

Глюкоза — наиболее распространенное вещество в пищевой промышленности, определяемое с помощью биосенсоров. Именно глюкозный биосенсор впервые описан в литературе [3] и глюкоза чаще всего является модельным веществом при разработке новых ферментных биосенсоров. Кроме того, во многих микробиальных процессах ферментации и при росте животных клеточных культур именно глюкоза является важным источником углерода.

Однако широкое использование глюкозных биосенсоров на практике лимитировано рядом их недостатков. В некоторых случаях — это недостаточно высокая чувствительность и стабильность сенсоров, но чаще — узкий линейный диапазон определяемых концентраций. Кроме того, рабочие характеристики известных глюкозных биосенсоров очень сильно зависят от условий среды (ионной силы, буферной емкости и pH), что постоянно необходимо учитывать при проведении анализа, особенно при использовании в проточных системах.

## Примеры проточных биосенсорных систем для мониторинга глюкозы

Метод определения	Носитель фермента	Используемый биологический агент	Источник информации
Кислородный электрод	Бiosинтетическая эпоксидная колонка	<i>Escherichia coli</i>	[4]
Амперометрический	Ферментная мембрана	Реактор Cellobiase	[5]
Амперометрический	Графитовая паста с диметилферроценом	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[6]
Амперометрический	Графитовая паста с тетрагидрофураном	Ацидофильные метилотрофные бактерии MB 53	[7]
Потенциометрический	Ионоселективный электрод	<i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	[8]
Хемилюминесцентный	Колонка CPG	<i>Penicillium chrysogenum</i>	[9]

В таблице приведены некоторые примеры глюкозных биосенсоров, предназначенных для работы в проточных системах контроля биотехнологических процессов.

Амперометрические биосенсоры — самый распространенный, обширный и успешный в плане коммерциализации класс приборов биомолекулярной электроники [10, 11]. Огромный прогресс в разработке амперометрических микроэлектродов в последние годы стал возможен благодаря современным достижениям в области микромеханики и увеличению чувствительности и качества сопутствующего электрического оборудования. Амперометрический метод основан на измерении плотности тока, протекающего в электрохимической ячейке, при постоянном прикладываемом потенциале. Эта плотность тока — функция электрохимически активных частиц раствора, окисление или восстановление которых происходит на поверхности рабочего электрода.

Основная цель данной работы заключалась в разработке глюкозного амперометрического биосенсора на основе углеродного волокна для работы в проточной системе, а также в оптимизации методики предварительной обработки электродов и получения мембран с высокой активностью для улучшения основных аналитических характеристик созданного биосенсора.

**Материалы и методы.** В работе применяли фермент глюкозооксидазу (ГОД) из *Penicillium vitale* с активностью 130 ед. акт/мг производства фирмы КНПО «Диагностикум» (Украина), глюкозу, бычий сывороточный альбумин (БСА) и 50 %-й водный раствор глутарового альдегида (ГА) фирмы «Sigma-Aldrich Chimie S. a. r. l.» (Франция).

В качестве рабочего буфера использовали калий-фосфатный раствор ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,2) отечественного производства. Все реактивы, используемые в работе, были отечественного и

импортного производства и имели квалификации «ос. ч.» и «х. ч.»

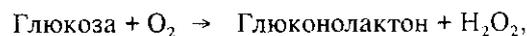
В работе также использованы микроэлектроды собственного производства на основе углеродных моноволокон (диаметр — 30 мкм, длина рабочей части — 500 мкм) [12].

Амперометрические измерения проводили с использованием циклической треугольной развертки потенциала от 850 до 1100 мВ в проточно-инжекционной системе с помощью потенциостата ПИ-50-11. Применяли трехэлектродную схему: рабочий электрод на основе углеродного моноволокна, хлор-серебряный электрод сравнения и вспомогательный платиновый электрод.

Для образования биоселективных мембран готовили смесь ГОД и БСА с конечными концентрациями 15 % в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,2. В смесь добавляли глицерин до конечной концентрации 10 % для стабилизации иммобилизованного фермента, а также для предотвращения преждевременного высыхания раствора, нанесенного на поверхность преобразователя. Смесь ГОД—БСА наносили на рабочую поверхность электрода методом погружения. Для полимеризации мембран датчики помещали в атмосферу насыщенных паров ГА, после чего подсушивали на воздухе в течение 10 мин.

**Результаты и обсуждение.** В основе работы амперометрических ферментных биосенсоров для определения глюкозы на основе глюкозооксидазы лежит следующая реакция:

ГОД



которая сопровождается накоплением электрохимически активного вещества перекиси водорода, что позволяет использовать для создания биосенсоров амперометрические электроды на основе угле-

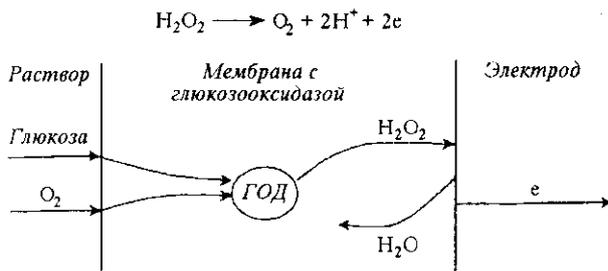


Рис. 1. Схема процесса определения концентрации глюкозы на ферментном амперометрическом электроде

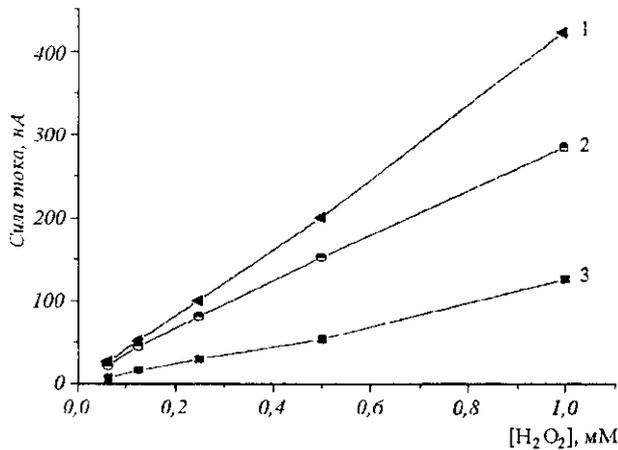


Рис. 2. Зависимость чувствительности амперометрического датчика к перекиси водорода при использовании различных методов предварительной обработки углеродных электродов (см. текст)

родных волокон [12]. Процесс, протекающий на глюкозном амперометрическом электроде, представлен на рис. 1.

Для увеличения чувствительности датчиков изучены условия предварительной обработки (активации) электродов.

Проверено несколько методов предобработки углеродных электродов, а именно:

1) обработка хромовой смесью на протяжении 30 с, выдерживание в смеси «пиранья» (3 V H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 1V 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в течение 30 с и последующая промывка 5 M NaOH в течение 1 мин, после промывки дистиллированной водой и ацетоном электрод был подвергнут электрохимической обработке (циклическая развертка потенциала от 0 до 1200 мВ в 5 мМ фосфатном буфере, рН 7,2, скорость развертки 100 мВ/с, длительность — 5 мин) (рис. 2, кривая 1);

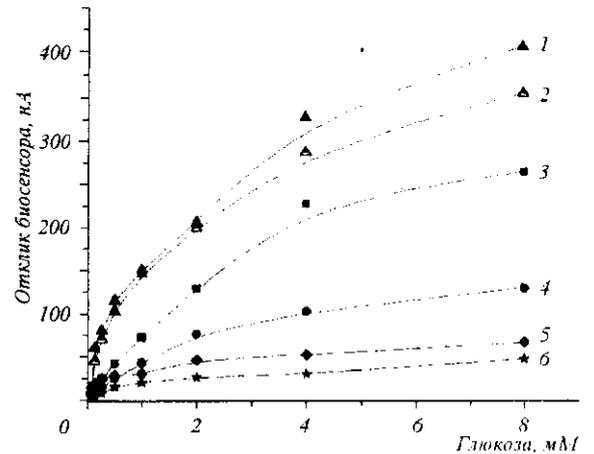


Рис. 3. Зависимость величины отклика амперометрического глюкозного биосенсора от температуры паров глутарового альдегида и времени экспозиции в них: 1 — 19 °С, 9 мин; 2 — 17 °С, 11 мин; 3 — 19 °С, 3 мин; 4 — 19 °С, 11 мин; 5 — 21 °С, 9 мин; 6 — 21 °С, 7 мин

2) обработка хромовой смесью на протяжении 30 с, выдерживание в смеси «пиранья» (3 V H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 1V 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в течение 30 с и последующая промывка 5 M NaOH в течение 1 мин, после промывки дистиллированной водой и ацетоном высушивание на воздухе в течение 5 мин (рис. 2, кривая 2);

3) обработка хромовой смесью на протяжении 5 мин с промывкой в проточной системе 5 мМ буфером и просушивание в сушилке, содержащей гидроокись калия, в течение 10 мин (рис. 2, кривая 3).

В дальнейших экспериментах использовали амперометрические датчики, предварительно обработанные согласно методике 1.

Следующим этапом работы была отработка и оптимизация метода иммобилизации ГОД на поверхности углеродного электрода. Изучены зависимости чувствительности биосенсоров к глюкозе от времени и температуры выдержки мембран в парах ГА. Таким образом подобраны оптимальные условия иммобилизации глюкозооксидазы на поверхность углеродных электродов для получения более чувствительных мембран. Из рис. 3 видно, что оптимальными условиями иммобилизации были температура 19 °С и время выдерживания в парах ГА 9 мин.

Рабочие характеристики биосенсоров часто очень сильно зависят от условий среды, поэтому изучение свойств реальных жидкостей, а именно — буферной емкости, ионной силы и рН имеет большое значение.

Исследования действия ионной силы и буфер-

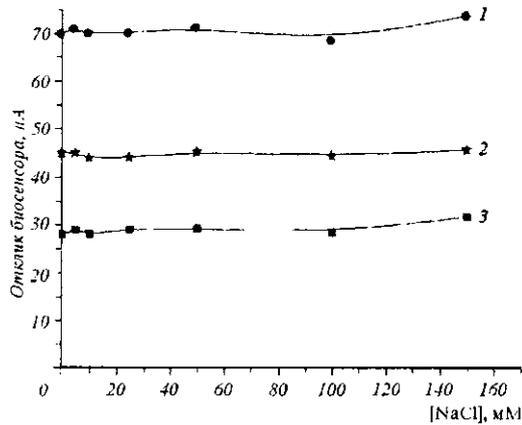


Рис. 4. Зависимость величины отклика глюкозного амперометрического биосенсора от концентрации фонового электролита в 25 мМ фосфатном буфере, рН 7,4. Концентрация добавляемой глюкозы — 1 мМ (1); 0,6 мМ (2); 0,37 мМ (3)

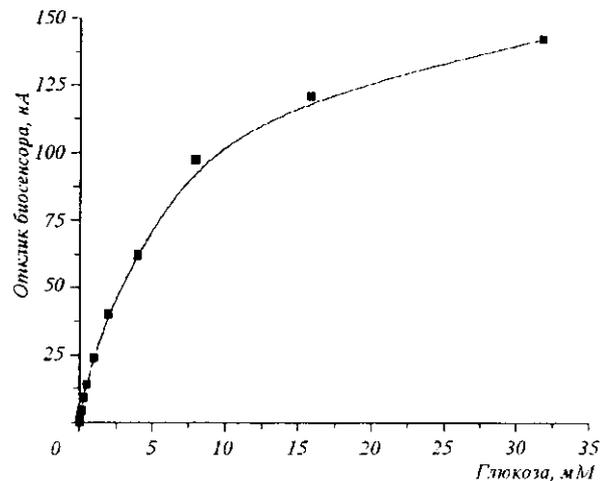


Рис. 7. Калибровочная кривая глюкозного амперометрического микробиосенсора на основе углеродного электрода

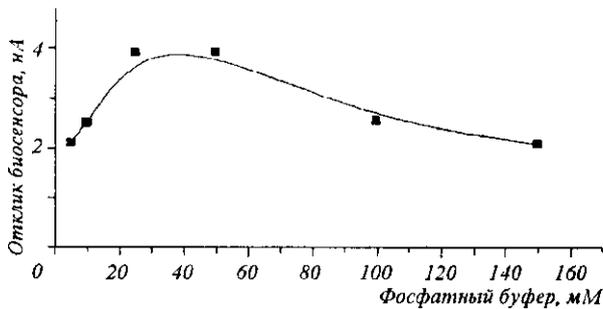


Рис. 5. Зависимость величины отклика глюкозного амперометрического биосенсора от буферной емкости раствора, рН 7,4. Концентрация добавляемой глюкозы 2 мМ

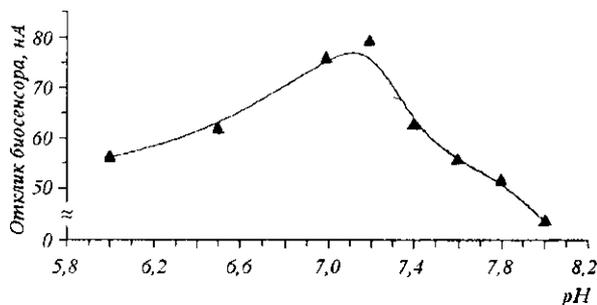


Рис. 6. Зависимость величины отклика глюкозного амперометрического биосенсора с иммобилизированной глюкозооксидазой от рН раствора. Измерения проводили в 25 мМ фосфатном буфере, 150 мМ NaCl. Концентрация добавляемой глюкозы составляет 3,5 мМ

ной емкости на величину отклика глюкозного амперометрического биосенсора на основе углеродного микроэлектрода показали (рис. 4, 5), что изменения концентрации фонового электролита в буфере и изменение буферной емкости не влияют значительно на величину отклика биосенсора. Это является большим преимуществом разработанного биосенсора, поскольку физиологические растворы, культуральные среды и пищевые продукты обычно имеют высокую ионную силу и буферную емкость, что существенно затрудняет использование кондуктометрических и потенциометрических сенсоров для таких анализов [13].

Известно, что скорость ферментативных реакций сильно зависит от значения рН. Это обусловлено тем, что в катализе участвуют функциональные группы белка, способные протонироваться или депротонироваться в зависимости от рН раствора, а реакционноспособной является, как правило, только одна из этих форм [14]. В результате показано, что оптимум работы углеродного электрода с иммобилизованной ГОД наблюдается при рН 7,2 (рис. 6), что совпадает с результатами, полученными ранее [15].

На рис. 7 представлена зависимость величины отклика глюкозного амперометрического биосенсора от концентрации глюкозы. Измерения проводили в 25 мМ фосфатном буфере с добавлением 150 мМ NaCl в качестве фонового электролита, рН 7,2, при температуре 36 °С. Глюкозный микробиосенсор характеризуется линейной зависимостью величины отклика биосенсора от концентрации глюкозы в диапазоне 0—8 мМ и минимально определяемой пороговой концентрацией 0,03 мМ.

Таким образом, в ходе работы были определены оптимальные условия получения активной мембраны с глюкозооксидазой для создания амперометрического ферментного биосенсора на основе углеродного волокна для определения глюкозы в модельных растворах. Разработанный лабораторный прототип может быть использован в пищевой промышленности для контроля и оптимизации биотехнологических процессов.

Часть данной работы выполнена благодаря финансовой поддержке фонда INTAS (проект № 00-0751).

L. V. Danyleyko, O. N. Schuvailo, V. M. Arkhipova,  
A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych

Development of amperometric enzyme biosensor based on carbon fibre electrode and immobilized glucose oxidase

#### Summary

A glucose amperometric biosensor has been developed, its characteristics being studied. The stipulation of obtaining active membrane based on glucose oxidase has been optimized. The changes in both background electrolyte concentration and buffer capacity have been shown to affect the biosensor response insufficiently. The optimum pH is found to be 7.2. The biosensor dynamic range is shown to be of 0–8 mM, the detection limit of 0.03 mM. The biosensor developed is recommended for the application in food industry to control and optimize biotechnological processes.

Л. В. Данилейко, О. М. Щувайло, В. М. Архипова,  
О. П. Солдаткин, С. В. Дзядевич

Розроблення амперометричного ферментного біосенсора на основі вуглецевого волокна та іммобілізованої глюкозооксидази

#### Резюме

Розроблено глюкозний амперометричний біосенсор, вивчено його характеристики та визначено оптимальні умови для отримання активної мембрани з глюкозооксидазою. Встановлено, що зміна концентрації фонового електроліту в буфері та зміна буферної ємності несуттєво впливають на величину відгуку біосенсора, оптимум роботи карбонового електроду з іммобілізованою глюкозооксидазою спостерігається при рН 7,2. Глюкозному мікробіосенсору притаманна лінійна залежність величини відгуку від концентрації глюкози в діапазоні 0–8 мМ. Мінімальна порогова концентрація, яку можна визначити за його допомогою, складає 0,03 мМ. Створений біосенсор рекомендується використовувати в харчовій промисловості для контролю та оптимізації біотехнологічних процесів.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luong J. H. T., Groom C. A., Male K. B. The potential role of biosensors in the food and drink industries // *Biosensors and Bioelectronics*.—1991.—6.—P. 547–554.
2. Warsinke A. Biosensors for food analysis // *Frontiers in*

biosensorics II. Practical applications / Eds F. W. Scheller, F. Schubert, J. Fedrowitz.—Basel: Birkhauser, 1997.—P. 121–139.

3. Clark L. C., Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery // *Ann. New York Acad. Sci.*—1962.—102.—P. 29–45.
4. Schugerl K., Brandes L., Wu X., Bode J., Ree J. I., Brandt J., Hitzmann B. Monitoring and control of recombinant protein production // *Anal. chim. acta.*—1993.—279.—P. 3–8.
5. Leung K. K., Petersen J. N., Lee J. M. A system for on-line determination of glucose concentration // *Bioprocess Eng.*—1991.—7.—P. 19–23.
6. Lelong P., Cellard H., Pardo D., Cavalie J. M. Automation of glucose measurement in fermentor broths // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*—1991.—36.—P. 173–177.
7. Grundig B., Strehlitz B., Kotte H., Ethner K. Development of a process-FIA system using mediator-modified enzyme electrodes // *J. Biotechnol.*—1993.—31, N 3.—P. 277–287.
8. Brand U., Brandes L., Koch V., Kullik T., Reinhardt B., Ruther F., Scheper T., Schugerl K., Wang S., Wu X., Ferretti R., Prasad S., Wilhelm D. Monitoring and control of biotechnological production processes by Bio-FET-FIA-sensors // *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*—1991.—36, N 2.—P. 167–172.
9. Christensen L. H., Nielsen J., Villadsen J. Monitoring of substrates and products during fed-batch penicillin fermentations on complex media // *Anal. chim. acta.*—1991.—249, N 1.—P. 123–136.
10. Дзядевич С. В. Амперометрические биосенсоры. Основные принципы работы и особенности датчиков разных поколений // *Біополімери і клітина.*—2002.—18, № 1.—С. 13–25.
11. Дзядевич С. В. Амперометрические биосенсоры. Современные технологии и коммерческие варианты анализаторов // *Біополімери і клітина.*—2002.—18, № 5.—С. 363–376.
12. Щувайло О. Н., Данилейко Л. В., Архипова В. Н., Дзядевич С. В., Ельская А. В., Сеспуглио Р., Солдаткин А. П. Разработка микробіосенсоров на основе углеродных волокон для определения глюкозы, ацетилхолина и холина *in vivo* // *Біополімери і клітина.*—2002.—18, № 6.—С. 489–495.
13. Архипова В. Н., Дзядевич С. В., Солдаткин А. П., Ельская А. В. Ферментные биосенсоры для определения пенициллина на основе кондуктометрических планарных электродов и рН-чувствительных полевых транзисторов // *Укр. біохім. журн.*—1996.—68, № 1.—С. 26–36.
14. Березин И. В., Клячко Н. Л., Левашов А. В., Мартинек К., Можаяев В. В., Хмельницкий Ю. Л. Иммобилизованные ферменты // *Биотехнология.*—1987.—7.—С. 108–113.
15. Ельская А. В., Поломарчук В. И., Сандровский А. К., Солдаткин А. П., Стародуб Н. Ф., Стриха В. И., Фролов О. С., Хусточка Л. Н., Шульга А. А. Биосенсоры на основе рН-чувствительных полевых транзисторов для определения глюкозы // *Электрохимия.*—1989.—25, № 5.—С. 674–679.

УДК 577.15; 573.6

Надійшла до редакції 14.05.02