

Мультибіосенсор на основі дріжджових клітин для визначення глюкози і сахарози у водних розчинах

О. Л. Кукла, М. І. Канюк¹, М. Ф. Стародуб¹, С. С. Нагорна^{1, 2}

Інститут фізики напівпровідників НАН України
Просп. Науки, 41, Київ, 03028, Україна

E-mail: kukla@isp.kiev.ua

¹Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України
Вул. Леонтовича, 9, Київ, 04030, Україна

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 154, Київ, 03143, Україна

*Розроблено багатоканальний мультибіосенсор на основі емнісних структур типу електроліт—діелектрик—напівпровідник з іоночутливим шаром нітриду кремнію та змінних альгінатних мембран з іммобілізованими дріжджовими клітинами *Candida krusei* УКМ Y-823, *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517 і *Cryptococcus laurentii* УКМ Y-1135 для одночасного визначення концентрації глюкози і сахарози. Принцип роботи мультибіосенсора ґрунтується на селективності дріжджових клітин до вуглеводів та пропорційному утворенні кислоти під час використання цих вуглеводів як субстратів. Діапазон вимірюваних концентрацій глюкози становить від 2 до 30 мМ, сахарози — від 2 до 50 мМ. Точність визначення цих вуглеводів у вказаних діапазонах складає 5—10 %.*

Ключові слова: мультибіосенсор, дріжджі, глюкоза, сахароза.

Вступ. В останні роки для проведення аналізу все частіше використовують біосенсори, виготовлені на основі живих клітин. Такі прилади завдяки компактності та незначним технологічним витратам є досить ефективними для проведення експрес-діагностики різних об'єктів [1]. Межі їхнього можливого використання дуже широкі — від визначення токсичних речовин у водних стоках [2] до аналізу якості продуктів і напоїв у харчовій промисловості [3]. Вже створено біосенсори на основі як звичайних мікроорганізмів [4], так і генетично та хімічно модифікованих [5]. Відомо біосенсори для визначення декількох речовин одночасно [3, 5].

Перевага клітинних мультибіосенсорів пов'язана

на з дешевизною одержання клітин та, зокрема, простотою технології виготовлення біологічних сенсорів з використанням дріжджових клітин. Крім того, дріжджі містять велику кількість ферментів, які можна застосовувати як чутливі елементи в біосенсорах [3, 5]. Недоліком біосенсорів на основі дріжджових клітин є те, що вони дають менший за величиною відгук порівняно з біосенсорами на основі чистих ферментів. Використання багатоканального біосенсора з можливістю швидкої заміни сенсорних мембран дає необхідну точність та відтворюваність результатів за рахунок одночасної реєстрації відгуків від декількох однакових сенсорних елементів [6—8]. Це дозволяє створити недорогі чутливі біосенсори, які здатні працювати в польових умовах.

Метою даної роботи було розроблення біосенсора на основі емнісних структур типу електродит—діелектрик—напівпровідник (ЕДН) з іоночутливим шаром нітриду кремнію та використанням дріжджових клітин як чутливих елементів для визначення вуглеводного складу розчинів на потреби цукрової промисловості. Принцип роботи біосенсора заснований на селективній дії дріжджових клітин до певних вуглеводів та пропорційному утворенні кислоти при використанні вуглеводів як субстратів.

Матеріали і методи. Мультибіосенсор, розроблений на основі кремнієвих структур $\text{Si-SiO}_2\text{-Si}_3\text{N}_4$ із рН-чутливим шаром нітриду кремнію, містить від 10 до 20 плоских мікрореакторних комірок, утворених ущільненням нітридно-кремнієвої поверхні з проточною системою напуску рідинних зразків [6—8]. Проточна система має від двох до чотирьох паралельно розташованих каналів, у кожному з яких розміщено до п'яти ЕДН-сенсорних комірок. Загальний вигляд такої сенсорної лінійки наведено на рис. 1. Всі комірки мають спільний верхній електрод (рис. 1, а), де зв'язок кремнієвої основи з останнім утворюється за допомогою алюмінієвого контакту. На рис. 1, б, наведено детальну схему однієї з сенсорних комірок, яка включає кремнієву рН-чутливу структуру, герметичне ущільнення до рідинного потоку, внутрішній електродит та металевий протиелектрод.

Фізико-хімічні зміни, що відбуваються у досліджуваному розчині, реєстрували за допомогою методу вольт-емнісних вимірів одночасно для всіх емнісних каналів сенсорного масиву. Для всіх використаних дріжджових клітин результатом селективних реакцій з відповідними субстратами є утворення кислоти, що супроводжується дисоціацією іонів водню в реакційному об'ємі. Протони дифундують до рН-чутливої поверхні і змінюють поверхневий потенціал ЕДН-структури, який і фіксується за допомогою вимірювання C/V кривої. Сигнал відгуку сенсорного каналу визначають за зсувом C/V кривої по осі напруги. Чутливість ЕДН-структур у діапазоні значень рН 2—9 складала близько 45 мВ/рН. Похибка вимірювання величини рН для стандартних буферних розчинів не перевищувала 5 %.

Для визначення концентрації глюкози і сахарози у водних розчинах використано три види дріжджів: *Candida krusei* УКМ Y-823 (утворює кислоту в разі глюкози як субстрату), *Saccha-*

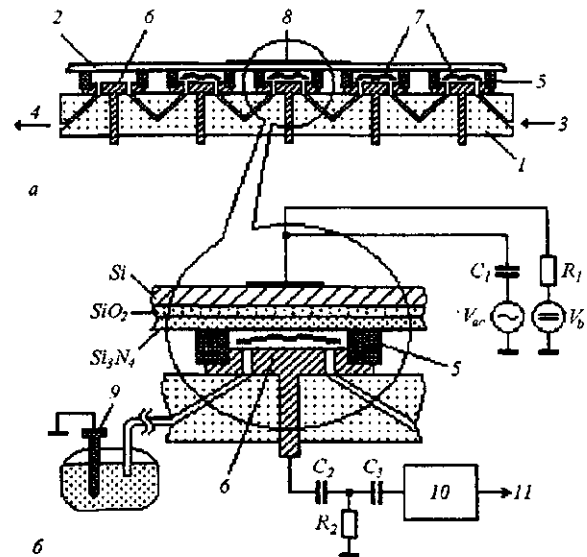


Рис. 1. Схема багатоканального біосенсора (а: 1 — корпус; 2 — чутлива структура $\text{Si-SiO}_2\text{-Si}_3\text{N}_4$; 3, 4 — вхід і вихід проточного каналу відповідно; 5 — гумова герметизація; 6 — металічний протиелектрод; 7 — мембрани з іммобілізованими дріжджовими клітинами; 8 — алюмінієвий контакт для кремнію) та вимірювальна комірка і електрична схема (б: 9 — електрод порівняння; 10 — C/V перетворювач; 11 — підключення до ПК)

romyces cerevisiae УКМ Y-517 і *Cryptococcus laurentii* УКМ Y-1135 (утворюють кислоту, якщо глюкоза і сахароза є субстратами). Дріжджові клітини вирощували на поживному середовищі Рідер (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3,0; MgSO_4 — 0,7; NaCl — 0,5; KH_2PO_4 — 1,0; K_2HPO_4 — 0,1; джерело вуглеводів — сахароза і глюкоза 10,0; дріжджовий автолізат — 0,5 (рН 6,0—6,5, температура 24—30 °С).

Під час роботи з багатоканальним мультибіосенсором мембрани з іммобілізованими дріжджовими клітинами вносили одночасно в різні мікрореакторні комірки. Одну комірку використовували як контрольну (референтну). До неї вносили 1 %-ву кальцій-альгінатну мембрану, яка не містила клітин дріжджів. У проточну систему вводили розчини різних субстратів. Значення сигналів відгуків для всіх сенсорних каналів знаходили відніманням від величин одержаного відгуку величини сигналу референтного каналу. Усі виміри здійснювали при кімнатній температурі. Оптимально достатній час для вимірювання сигналів відгуків в усіх випадках складав 20 хв. Сигнали реєстрували у стандартних буферних розчинах: 0,85 % NaCl в 0,5—1,0 мМ трис- HCl (рН 7,3).

Сенсорні мембрани на основі дріжджових

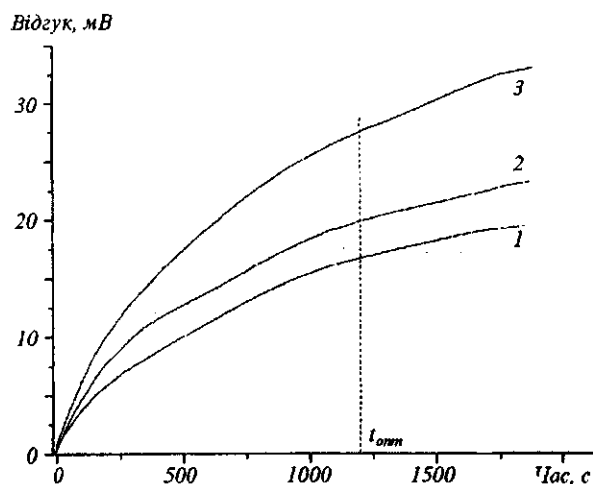


Рис. 2. Типові криві залежності відгуків сенсора на основі клітин *Candida krusei* УКМ Y-823 від концентрації глюкози: 1 — 10 мМ; 2 — 15 мМ; 3 — 30 мМ; $t_{\text{опт}}$ — оптимальний час вимірювання відгуку

клітин виготовляли в такий спосіб: вирощені на рідкому поживному середовищі протягом двох днів дріжджі центрифугували (15 хв, 5000 об/хв), після чого осад ресуспендували в 0,85 %-му розчині NaCl. Суспензію знову центрифугували. Одержані таким чином клітини змішували з 2 %-м розчином альгінату натрію у співвідношенні 1:1. Суміш наносили на рівну поверхню і обробляли 1 %-м розчином CaCl_2 до утворення міцної кальцій-альгінатної мембрани. Створені дріжджові мембрани використовували одноразово.

Результати і обговорення. Протягом роботи здійснено вимірювання відгуків біосенсорів на основі трьох штамів дріжджів (*C. krusei* УКМ Y-823, *S. cerevisiae* УКМ Y-517 і *C. laurentii* УКМ Y-1135) у водних розчинах глюкози і сахарози з концентрацією від 2 до 50 мМ. На рис. 2, 3 показано типові криві відгуків двох типів сенсорів на різну концентрацію глюкози (сахарози) в розчині. Аналіз одержаних даних дозволяє зробити висновок про те, що сенсор на основі клітин *C. krusei* 823 селективно чутливий до глюкози, тобто утворює кислоту лише при застосуванні глюкози як субстрату, в той же час у разі сахарози та лактози сигнали відгуків відсутні в межах похибки вимірювань. Сенсор на основі клітин *S. cerevisiae* 517 і *C. laurentii* 1135 утворює кислоту при використанні як глюкози, так і сахарози як субстратів. Крім того, сенсор на основі клітин *C. laurentii* 1135 утворює кислоту також при використанні лактози як субстрату. В

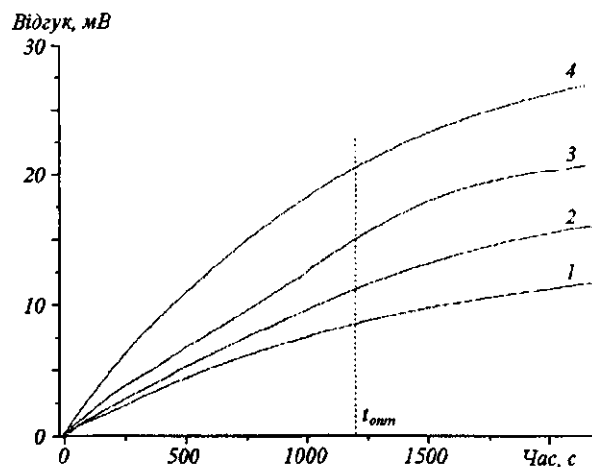


Рис. 3. Типові криві залежності відгуків сенсора на основі клітин *Cryptococcus laurentii* УКМ Y-1135 від концентрації сахарози: 1 — 5 мМ; 2 — 7,5 мМ; 3 — 20 мМ; 4 — 40 мМ; $t_{\text{опт}}$ — оптимальний час вимірювання відгуку

Чутливість сенсорів на основі відповідних клітин до вуглеводів (приріст відгуку в межах декади концентрацій від 3 до 30 мМ)

Сенсор на основі мікроорганізму	Чутливість, мВ/рС		
	Глюкоза	Сахароза,	Лактоза
<i>Candida krusei</i> УКМ Y-823	30	—	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> УКМ Y-517	20	18	—
<i>Cryptococcus laurentii</i> УКМ Y-1135	15	14	11

П р и м і т к а. «—» — сигнал відгуку відсутній в межах похибки вимірювань.

таблиці наведено значення чутливості сенсорів на основі відповідних клітин до згаданих вуглеводів, які свідчать про існуючу селективність даних сенсорів.

Залежності відгуків сенсорів на основі клітин *C. krusei* 823 і *S. cerevisiae* 517 від концентрації глюкози та сенсорів на основі клітин *C. laurentii* 1135 і *S. cerevisiae* 517 від концентрації сахарози наведено на рис. 4 і 5 відповідно. Вони можуть служити калібрувальними кривими для визначення концентрації окремих відповідних вуглеводів.

Діаграма залежності відгуків сенсора на основі клітин *S. cerevisiae* 517 від концентрації суміші глюкози і сахарози за постійної концентрації глю-

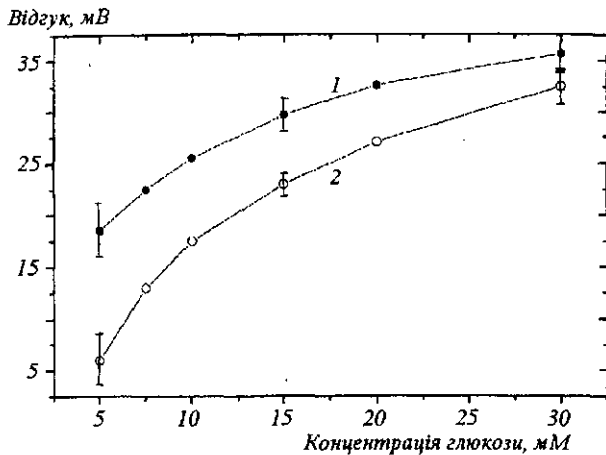


Рис. 4. Калібрувальні криві залежності від концентрації глюкози відгуків сенсорів на основі клітин: 1 — *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517; 2 — *Candida krusei* УКМ Y-823

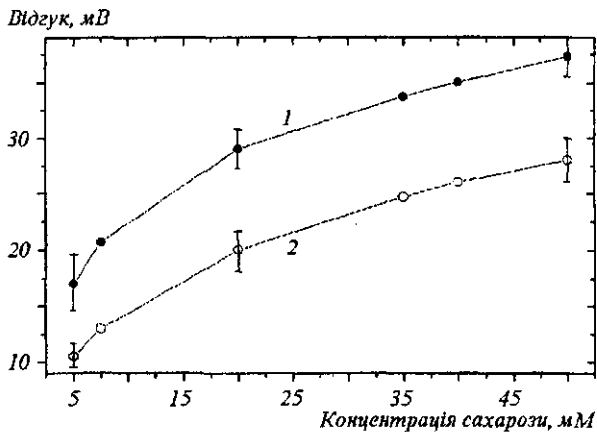


Рис. 5. Калібрувальні криві залежності від концентрації сахарози відгуків сенсорів на основі клітин: 1 — *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517; 2 — *Cryptococcus laurentii* УКМ Y-1135

кози в розчині (7,5 мМ), але за різної концентрації сахарози (5,0; 7,5 і 10,0 мМ) представлена на рис. 6. Приріст відгуку сенсора при збільшенні концентрації сахарози в суміші глюкози і сахарози за постійної концентрації глюкози свідчить про те, що сенсор на основі клітин *S. cerevisiae* 517 практично одночасно реагує на обидва субстрати. Необхідно відзначити, що це твердження стосується також сенсора на основі клітин *C. laurentii* 1135.

Роздільне визначення згаданих вуглеводів у суміші здійснюється у такий спосіб. За допомогою селективного до глюкози сенсора на основі клітин *C. krusei* 823 спочатку визначається концентрація

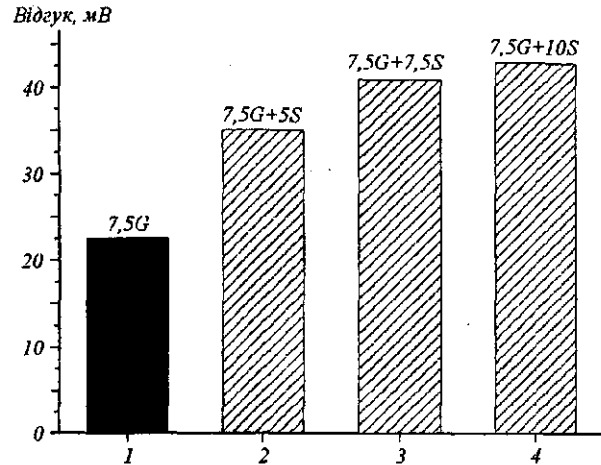


Рис. 6. Діаграма залежності відгуків біосенсора на основі клітин *Saccharomyces cerevisiae* УКМ Y-517 від концентрації глюкози та суміші глюкози і сахарози за постійної концентрації глюкози (7,5 мМ): 1 — відгук на глюкозу (G) та суміш глюкози і сахарози (S) (2 — 5 мМ сахароза; 3 — 7,5 мМ сахароза; 4 — 10 мМ сахарози)

глюкози в суміші. Потім за допомогою сенсора на основі клітин *S. cerevisiae* 517 тестується сумарна концентрація глюкози й сахарози. При цьому враховується величина відгуку цього сенсора окремо на вже визначену концентрацію глюкози за отриманим раніше калібрувальним графіком. Концентрація сахарози в суміші визначається за різницею відгуку цього сенсора на глюкозу і відгуку на суміш глюкози та сахарози. Ця різниця буде пропорційна концентрації сахарози в розчині.

Необхідно зазначити, що на відтворюваність сенсорних відгуків впливає технологічна розбіжність під час виготовлення дріжджових мембран. Тому для підвищення надійності визначення вуглеводного складу розчинів необхідно використовувати багатоканальні мультисенсори з дублюванням комірок, у яких містяться набори однакових чутливих мембран, із використанням подальшої статистичної обробки даних сенсорного масиву. За таких умов точність вимірів глюкози і сахарози за допомогою розробленого мультисенсора на основі використаних дріжджових клітин становить 5—10 %.

Висновки. Показано можливість застосування розробленого багатоканального мультібіосенсора на основі мембран з іммобілізованими дріжджовими клітинами для одночасного селективного визначення концентрації різних вуглеводів (наприкладі глюкози і сахарози) як окремо, так і в їхній сумішах з використанням дріжджових мікроорганізмів *C. krusei* 823, *S. cerevisiae* 517 і *C. laurentii*

1135. Вимірюваний діапазон концентрацій глюкози становить від 2 до 30 мМ, сахарози — від 2 до 50 мМ. Точність визначення цих вуглеводів у вказаних діапазонах складає 5—10 %.

A. L. Kukla, M. I. Kanyuk, M. F. Starodub, S. S. Nagornaya

Multibiosensor on the basis of yeast cells for detection of glucose and sucrose in aqueous solutions

Summary

A multichannel biosensor based on capacitive structures of electrolyte-insulator-semiconductor type with ion-sensitive layer of silicon nitride and exchangeable alginate membranes with immobilized yeast cells *Candida krusei* UKM Y-823, *Saccharomyces cerevisiae* UKM Y-517 and *Cryptococcus laurentii* UKM Y-1135 for simultaneous determination of glucose and sucrose concentration has been developed. The multibiosensor operation is based on the selectivity of used yeast cells towards carbohydrates and proportional generation of acid when the carbohydrates are used by yeast cells as a substrate. The measurable glucose and sucrose concentration ranges are 2—30 mM and 2—50 mM, correspondingly. The accuracy of glucose and sucrose detection in these ranges is about 5—10 %.

Key words: multibiosensor, yeast, glucose, sucrose.

А. Л. Кукла, Н. И. Канюк, Н. Ф. Стародуб, С. С. Нагорная

Мультибиосенсор на основе дрожжевых клеток для определения глюкозы и сахарозы в водных растворах

Резюме

Разработан многоканальный мультибиосенсор на основе емкостных структур типа электролит—диэлектрик—полупроводник с ионочувствительным слоем нитрида кремния и сменных альгинатных мембран с иммобилизованными дрожжевыми клетками *Candida krusei* UKM Y-823, *Saccharomyces cerevisiae* UKM Y-517 и *Cryptococcus laurentii* UKM Y-1135 для одновременного определения концентрации глюкозы и сахарозы. Принцип работы мультибиосенсора основан на селективности дрожжевых клеток к углеводам и пропорциональном образовании кислоты при использовании углеводов дрожжевыми клет-

ками в качестве субстратов. Диапазон измеряемых концентраций глюкозы составляет от 2 до 30 мМ, сахарозы — от 2 до 50 мМ. Точность определения этих углеводов в указанных диапазонах равна 5—10 %.

Ключевые слова: мультибиосенсор, дрожжи, глюкоза, сахароза.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. D'Souza S. F. Microbial biosensors // Biosensors and Bioelectronics.—2001.—16.—P. 337—353.
2. Ignatov O. V., Gulii O. I., Singirtsev I. N., Shcherbakov A. A., Makarov O. E., Ignatov V. V. Effects of p-nitrophenol and organophosphorous nitroaromatic insecticides on the respiratory activity of free and immobilized cells of strains S-11 and BA-11 of *Pseudomonas putida* // Prikl. Biokhim. Mikrobiol.—2002.—38.—P. 278—285.
3. Lobanov A. V., Borisov I. A., Gordon S. H., Greene R. V., Leathers T. D., Reshetilov A. N. Analysis of ethanol-glucose mixtures by two microbial sensors: application of chemometrics and artificial neural networks for data processing // Biosensors and Bioelectronics.—2001.—16.—P. 1001—1007.
4. Belkin S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants // Curr. Opin. Microbiol.—2003.—6.—P. 206—212.
5. Gonchar M., Maidan M., Korpan Y., Sibirny V., Kotlyak Z., Sibirny A. Metabolically engineered methylotrophic yeast cells and enzymes as sensor biorecognition elements // FEMS Yeast Res.—2002.—2.—P. 307—314.
6. Кукла А. Л., Ширшов Ю. М., Канюк Н. И., Стародуб Н. Ф., Прохорович А. В. Мультиферментный сенсор на основе емкостных структур типа электролит—диэлектрик—полупроводник // Оптоэлектроника и полупроводниковая техника.—1998.—№ 33.—С. 63—69.
7. Starodub N. F., Kanyuk M. I., Kukla A. L., Shirshov Yu. M. Multi-enzymatic electrochemical sensor: field measurements and their optimisation // Analyt. Chim. Acta.—1999.—385.—С. 461—466.
8. Kukla A. L., Kanyuk N. I., Starodub N. F., Shirshov Yu. M. Multienzyme electrochemical sensor array for determination of heavy metal ions // Sensors and Actuators B.—1999.—57.—С. 213—218.

УДК 543.554; 582.282
Надійшла до редакції 03.11.04