

Биокompозит иммобилизованной на функциональных наноматериалах глюкозооксидазы – основа глюкозных биосенсоров с улучшенными характеристиками

*Р.В. Михайлова, Т.В. Семашко, А.Г. Лобанок, А.А. Шедько, О.Д. Демешко
Институт микробиологии НАН Беларуси*

Н. Герман¹, А. Каусайте², А. Раманавичус

*¹Государственный научно-исследовательский институт «Центр
Инновационной медицины», Вильнюс*

²Факультет химии, Вильнюсский университет, Вильнюс

Решение медико-социальных задач, обусловленных проблемой сахарного диабета, в значительной степени связано с разработкой современных методов контроля уровня глюкозы в крови – одного из самых распространенных тестов, выполняемых клинико-диагностическими лабораториями. Наиболее перспективные направления развития диагностических и биоаналитических методов исследования основаны на биосенсорных технологиях. Сегодня на мировом рынке биосенсорных систем доля глюкозных анализаторов составляет 85 %. Исследования разработчиков и производителей глюкозных биосенсоров или биоэлектрохимических глюкозных датчиков сконцентрированы на улучшении их эксплуатационных характеристик.

В настоящее время инновационным направлением в технологиях биосенсоров являются нанотехнологии, позволяющие улучшить характеристики биорецепторных элементов датчиков с помощью новых наноматериалов. Спектр наноматериалов, используемых в сенсорах, достаточно широк. Благодаря своим размерам (1 - 100 нм), наночастицы обладают уникальными физико-химическими свойствами, которые необходимы для создания нового поколения сенсорных устройств. При разработке биосенсоров на глюкозу широко используются наночастицы металлов, поскольку они обладают хорошими электрокаталитическими свойствами. Это наноструктуры на основе инертных металлов (Pt, Au, Ag, Ni), металлических сплавов, содержащих Pt, Au, Pb, Ir, Ru, Cu, Pd, и оксидов металлов (ZnO, CuO, Cu₂O, MnO₂, TiO₂, CeO₂, SiO₂, ZrO₂, Fe₃O₄). Биосенсоры, сконструированные на основе вышеуказанных наночастиц, характеризуются высокой селективностью, чувствительностью, быстрым временем отклика и стабильностью. Наночастицы используют как для модификации трансдьюсера, так и для иммобилизации фермента. Значительное количество исследований посвящены конструированию биосенсоров на основе наночастиц золота.

Цель данной работы - разработать на основе глюкозооксидазы и наночастиц золота биорецепторный элемент, обеспечивающий улучшение эксплуатационных характеристик глюкозного биосенсора.

Для выполнения указанной цели первоначально проведен сравнительный анализ препаратов глюкозооксидаз (ГО) грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium*:

ГО *A. niger* (Roche, Франция), ГО *A. niger* (Biozyme, США), ГО *A. niger* (Fluka, США) и отечественных: ГО *P. adametzii* (Институт микробиологии НАН Беларуси), ГО *P. funiculosum* (Институт микробиологии НАН Беларуси). Установлено, что удельная активность ГО грибов рода *Aspergillus* составила 130,5, 129,3 и 164,6 ед/мг белка, а ферментов грибов рода *Penicillium* – 95,2 и 120,6 ед/мг белка соответственно. Таким образом, ГО грибов рода *Penicillium* характеризовались более низкой в 1,1-1,7 раза удельной активностью.

Электрофоретический анализ вышеуказанных ферментных препаратов в присутствии додецилсульфата натрия показал наличие минорных полос сопутствующих белков наряду с доминирующими белковыми зонами ГО. Количество примесных белков в препаратах ГО *A. niger* было на 30-35 % меньше, чем в препаратах ГО *P. adametzii* и *P. funiculosum*. При этом каталаза, примесный белок, мешающий электрохимическим исследованиям, была обнаружена только в ферментных препаратах фирм Roche и Biozyme.

Согласно результатам изоэлектрофокусирования ГО грибов рода *Aspergillus* представлены одной молекулярной формой фермента (pI 4,3-4,4), ГО *P. adametzii* имеет 3 формы, а ГО *P. funiculosum* – 4 (pI 4,4-4,8).

Установлено, что несмотря на более низкую удельную активность ГО грибов рода *Penicillium*, эти ферменты характеризуются более высокой эффективностью связывания глюкозы. Данный показатель (kkat/Km) был в 1,3-2,1 раза, выше, чем у коммерческих ферментов. Для дальнейших исследований отобраны ГО *P. adametzii*, *P. funiculosum* и *A. niger* (фирма Fluka, США).

Исполнителями проекта - сотрудниками Вильнюсского университета были синтезированы и охарактеризованы наночастицы золота размером 3, 6, 13, 50 нм. Определено, что введение в препараты ГО наночастиц золота (3-13 нм) практически не влияет на эффективность окисления субстрата ферментами, а включение в препараты 50 нм наночастиц уменьшает данный показатель на 32-35,9 %.

Установлено также, что максимальная сила тока отмечается при применении электродов, сконструированных на основе ГО, иммобилизованных на наночастицах размером 3-13 нм. При этом лучшие результаты (74-118 μ A) получены при использовании в качестве ферментного препарата ГО *P. funiculosum*, который был выбран для дальнейшей работы.

С целью определения оптимального состава биоконструкта глюкозного биосенсора проведен анализ влияния медиаторов (1,10-phenantroline-5,6-dione, 9,10-phenanthrenequinone, phenazine methosulphate, tetrathiafulvalene) на физико-химические, спектральные и каталитические свойства иммобилизованной на наночастицы золота (3-13 нм) ГО *P. funiculosum*.

Установлено, что медиаторы повышают на 2-44 % сродство иммобилизованного фермента к глюкозе и эффективность ее окисления. Максимальное повышение достигнуто при комбинации ГО *P. funiculosum* с 1,10-phenantroline-5,6-dione и наночастицами золота размером 3 и 6 нм.

Спектрофлуориметрически определено, что медиаторы и наночастицы практически не влияют на спектр возбуждения белка. При исследовании

спектра испускания биокомпозитов, содержащих ГО *P. funiculosum* и наночастицы, наблюдалось уменьшение его интенсивности на 3,2-14,1 %. Дополнение биокомпозитов медиаторами приводило к снижению данного показателя на 18,8-82,8 %. Полученные результаты свидетельствуют о конформационных изменениях в структуре апофермента. Наименьшие изменения в конформации белка отмечены при использовании 1,10-phenentrolin-5,6-dione в качестве медиатора.

Анализ термостабильности полученных биокомпозитов показал, что, независимо от используемых наночастиц, по стабильности можно выделить композиты, содержащие ГО *P. funiculosum* и медиаторы - 1,10-phenentrolin-5,6-dione, 9,10-phenentrenequinone, tetrathiafulvalene, константы термоинактивации в данных случаях составляли $(1,07-1,31) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$. Лучшая операционная стабильность (23,5-27,1 суток) получена для композитов, состоящих из ГО *P. funiculosum*, медиаторов 1,10-phenentrolin-5,6-dione и 9,10-phenentrenequinone. Максимальный результат (27,1 суток) наблюдался при иммобилизации ГО *P. funiculosum* на наночастицы золота размером 6 нм и применении в качестве медиатора 1,10-phenentrolin-5,6-dione.

Таким образом, в результате выполнения исследований проведен сравнительный анализ свойств ГО грибов родов *Aspergillus* и *Penicillium*, получены и охарактеризованы наночастицы золота, отобран эффективный медиатор, определен оптимальный состав биокомпозита глюкозного сенсора: ГО *P. funiculosum* и 1,10-phenentrolin-5,6-dione, иммобилизованные на 6 нм золотые наночастицы.