

УДК 544.6:57

КИСЛОВА О.В.

Київський національний університет технологій та дизайну

ЕЛЕКТРОХІМІЧНІ ФЕРМЕНТАТИВНІ БІОСЕНСОРИ

Мета. Дати характеристику сучасних електрохімічних ферментативних біосенсорів різного типу дії, порівняти принципи їх роботи, переваги та недоліки, особливості застосування кожного типу біосенсорів, узагальнити методи підвищення їх селективності та чутливості, подальші перспективи розвитку.

Методика. Аналітичні методи порівняння принципів дії електрохімічних ферментативних біосенсорів різного типу.

Результати. Проведені дослідження показали переваги та недоліки ферментативних біосенсорів, особливості електрохімічних перетворень, що лежать в основі їх дії.

Наукова новизна. На основі дослідження електрохімічного механізму дії різних типів біосенсорів окреслено можливі напрямки подальшого їх вдосконалення.

Практична значимість. Узагальнено чинники, необхідні для створення високоефективних сучасних біоаналітичних приладів: вибір матеріалу електроду, підготовка ферменту, створення умов для підвищення чутливості приладів шляхом попереднього накопичення аналіту біля індикаторного електроду або на ньому; вдосконалення електрохімічних вимірів.

Ключові слова: біосенсори електрохімічні, ферментативні, потенціометричні, амперметричні, кондуктометричні.



Вступ. В останні десятиріччя інтенсивного розвитку набули біоелектронні аналітичні пристрої – біосенсори. Вони містять біологічний матеріал, що продукує або селективно реагує на досліджувану речовину, та генерують сигнал, пропорційний її концентрації [1,2]. Принцип дії більшості електрохімічних біосенсорів переважно заснований на реакціях ферментативного каталізу, які супроводжуються виділенням або поглинанням електронів. У цьому випадку субстрат або продукт ферментативної реакції здатні швидко і переважно оборотно окиснюватись або відновлюватись на електроді при накладенні на нього відповідного потенціалу [2-4].

Біосенсори дозволяють отримувати і переробляти експрес-інформацію про хімічний склад тих чи інших об'єктів, здатні підвищувати якість контролю технологічних процесів та стану навколишнього середовища, точність медичних аналізів, здійснювати оцінку складу харчових продуктів [3-5].

Постановка завдання. Охарактеризувати електрохімічні ферментативні біосенсори різних типів дії, порівняти принципи їх роботи, переваги та недоліки, узагальнити шляхи вдосконалення.

Результати дослідження. Загальний принцип роботи ферментативних біосенсорів полягає в наступному: досліджувана речовина дифундує через напівпроникну мембрану в тонкий шар біокатализатора, де відбувається ферментативна реакція, характер якої загалом залежить від природи ферменту та типу його каталітичної дії. Найчастіше для конструювання біосенсорів використовуються ферменти класу оксидоредуктаз, гідролаз, трансфераз. Оскільки нативний фермент здатний зберігати свої властивості тільки протягом короткого періоду часу, використовують так звані іммобілізовані ферменти, які або

закріплені на поверхні адсорбентів (силікагель, вугілля або целюлоза), або введені в плівку пористого полімеру, або ковалентно прив'язані до підкладки [6]. Це значно підвищує стабільність ферменту, запобігає зниженню каталітичної активності та дає змогу використовувати його повторно.

Складовими частинами біосенсорів є наступні компоненти:

1) селективний біологічний матеріал, який високо специфічно пов'язаний з досліджуваним компонентом. Це мікроорганізми, бактерії, тканини, живі клітини, органели, клітинні рецептори, ферменти, антитіла, нуклеїнові кислоти;

2) фізико-хімічні перетворювачі сигналів, що виникають в результаті взаємодії аналіту з біоселективним елементом, в інший сигнал, який вимірюють з використанням оптичних, п'єзоелектричних, електрохімічних, термічних та інших методів детекції;

3) сучасні електронні системи посилення, відтворення та реєстрації сигналу [1,6].

Комбінація багатоманітних видів біологічного матеріалу з різними типами фізико-хімічних перетворювачів сигналів призводить до утворення значної кількості біосенсорів, більшість з яких орієнтована на аналіз біологічних рідин [1].

Найбільшого поширення набули електрохімічні методи вимірювання сигналу, основу яких складають процеси переносу заряду на межі розділу фаз [2]. Цим електрохімічні методи принципово відрізняються від оптичних - флуориметричного, фотометричного, де сигнал обумовлений змінами, що відбуваються в об'ємі розчину. При цьому оптичні та електрохімічні методи можуть вирішувати одні й ті ж завдання. Наприклад, можна реєструвати зміну окисно-відновних властивостей розчину фотометричним методом, використовуючи кольорові редокс-індикатори, або за допомогою спеціального редокс-електроду [6, 7].

Електрохімічний біосенсор складається з трьох електродів: робочого, електроду порівняння і допоміжного. На поверхню робочого електроду наносять біологічний матеріал, який специфічно вступає в реакцію з аналітом [8]. Заряджені продукти реакції створюють на робочому електроді потенціал, значення якого віднімається від потенціалу на електроді порівняння для отримання вихідного сигналу [1].

Ферментативний каталіз забезпечує біоселективними можливостями основну масу сучасних біосенсорів. Поєднання ферментативно-каталітичних і електрохімічних реакцій, що відбуваються на занурених у розчин електроліту електропровідних матеріалах, і супроводжуються виділенням або поглинанням електронів, дозволило розробити багато біосенсорів, зокрема для визначення глюкози, амінокислот, молочного цукру, пірувату, сечовини та інших метаболітів [3,4].

Електрокаталітичний транспорт електронів може здійснюватись кількома шляхами:

1) за допомогою електрохімічно активного специфічного проміжного низькомолекулярного дифузійно-рухомого переносника електронів;

2) прямим електрокаталітичним перенесенням електронів між електродом і активним центром ферменту;

3) з використанням органічних напівпровідників з включеними в них ферментами (відбувається перенесення електронів між активним центром ферменту і доменами в напівпровіднику) [9].

Електрохімічні біосенсори характеризуються низькою вартістю, малими габаритними розмірами, стабільністю сигналу, зручністю в експлуатації. До недоліків електрохімічних біосенсорів слід віднести чутливість до коливань температури та значень рН. До потенційних обмежень належить також неминучість стадії масопереносу реагентів на межі перетворювач - розчин. Вона може призвести до загального збільшення тривалості вимірювання або зменшення його чутливості. Подібне явище відоме як дифузійне обмеження або гальмування ферментативної реакції. Проте у ряді випадків процеси масопереносу на межі розділу фаз дозволяють істотно поліпшити аналітичні характеристики визначення компонентів ферментативної реакції, зокрема коли межа розділу фаз (електрод-розчин) є в той же час місцем локалізації ферменту. Відбувається також сорбційне концентрування досліджуваного компонента або його селективне перенесення до ферменту через допоміжну мембрану [9,10].

Оскільки електрохімічні перетворювачі здатні генерувати в ході реакції досліджуваної речовини з біоматеріалом на поверхні електроду потенціал або електричний струм, тому відповідно до принципів вимірювання їх поділяють на потенціометричні або амперометричні (вольтамперометричні) відповідно.

Дія потенціометричних датчиків заснована на вимірюванні різниці потенціалів при постійному (як правило, нульовому) струмі між активним електродом і електродом порівняння. Обраний індикаторний електрод повинен бути специфічним до іонів продукту або субстрату ферментативної реакції, повинен мати низьку межу виявлення потенціалвизначаючого йону, бути стабільним у роботі і нечутливим до шару іммобілізованого ферменту (біопрепарату). У потенціометричних біосенсорах індикаторним електродом є скляний та інші рН – метричні електроди, а також газочутливі електроди. Широкого розповсюдження набули і інші йоноселективні електроди: амонійний, нітратний, холіновий і т.д. [2,3].

Оскільки перебіг більшості ферментативних реакцій супроводжується зміною рН, саме скляний рН-метричний електрод знайшов широке застосування в конструкції ферментативних біосенсорів завдяки його високій специфічності до іонів, низькій межі виявлення, високій стабільності в роботі. Основним обмеженням рН-метричних методів є залежність сигналу від буферних властивостей середовища. Це звужує сферу їх практичного використання, оскільки є придатним тільки для проб, склад яких незначно відрізняється від робочих умов вимірювання сигналу і є постійним. Будь-які неферментативні процеси, що змінюють буферні властивості або рН реакційного середовища, впливають на величину вимірюваного сигналу. До числа таких небажаних процесів відносяться поглинання деяких летких домішок і газів з повітря (зокрема вуглекислого газу для лужних розчинів); неферментативні перетворення субстрату (окиснення, гідроліз та ін.), а також вплив поверхнево-активних речовин і поліелектролітів. Крім самих ферментів до числа останніх відноситься багато стабілізаторів (желатин, трегалоза, агар) і баластних білків, що містяться в препаратах ферментів [6,10].

Найбільшою популярністю на сьогоднішній день користуються амперометричні датчики. Принцип їх дії заснований на вимірюванні електричного струму, що генерується при окисненні (або відновленні) електроактивних частинок на поверхні робочого електрода при постійному значенні потенціалу [11].

Селективність амперометричного біосенсора визначається природою матеріалу поверхні електрода і величиною потенціалу протікання електрохімічних реакцій за участю досліджуваного компонента. Чутливість амперометричного біосенсора становить 10^{-8} - 10^{-9} моль/л. В біологічних середовищах з його допомогою можна визначити навіть дуже низькі концентрації субстрату - до 10^{-15} моль/л [1].

Оскільки сигнал сенсора не залежить від масопереносу електроактивних частинок до поверхні електрода, вимірювання відбувається достатньо швидко.

Фермент в режимі амперометричного біосенсора виявляє електрокаталітичну активність, тобто прискорює процес обміну електронами між субстратом і електродом. При адсорбції на твердих поверхнях (метали, кераміка, полімери) ферменти, як правило, зберігають свою структуру і каталітичну активність. В амперометричних ферментативних біосенсорах індикаторним електродом найчастіше є платиновий.

Амперометрія є перспективним напрямком розвитку біосенсорів для застосування як в умовах *in vivo*, так і *in vitro*. Проблема полягає лише в ефективному поєднанні специфічних біохімічних реакцій з процесами, що зумовлюють відповідний сигнал електрода. Такі сенсори можуть функціонувати у неоднорідному середовищі та при фізіологічній температурі 37°C [12].

Амперометричні перетворювачі придатні і для розв'язання оберненої задачі - оцінки активності ферменту за величиною вимірюваного струму при деякій певній концентрації субстрату. Подібні біосенсори знайшли застосування в медицині, зокрема в кардіології, де інформація про активність аспартатамінотрансферази і креатинкінази дозволяє оцінити глибину інфаркту в клінічних умовах [13].

Амперометричні біосенсори працюють при постійному потенціалі, що істотно спрощує приладове оформлення. Однак при цьому завжди спостерігається фоновий струм, величина якого може бути суттєвою при низьких концентраціях досліджуваної речовини. Корекція фонового струму і труднощі з калібруванням біосенсорів *in vivo* - дві серйозні проблеми, які потребують вирішення. Погіршується також чутливість і час відгуку біосенсора. Коливання цих параметрів можуть бути обумовлені так званим "отруєнням" електрода компонентами середовища.

Якщо флуктуації базової лінії обумовлені коливаннями концентрацій ендогенних електроактивних частинок, то можна використовувати двохелектродну систему, де один електрод вкритий мембраною на основі ферменту, а інший - мембраною, яка не містить ферменту. Передбачається, що електроактивні домішки однаковим чином дифундують через обидві мембрани [9].

У випадках, коли електрод забруднюється домішками з матриці або продуктом електрохімічної реакції, його піддають ступінчастій обробці при різних потенціалах. Цей спосіб дозволяє одночасно провести як обробку електрода (включаючи видалення плівок, що накопичились на його поверхні), так і встановлення базової лінії в області потенціалів, де відсутній електроліз. Застосовують також різні види імпульсної полярографії, вольтамперометрію (циклічну або з лінійною розгорткою потенціалу) [1].

Принцип дії ємнісних біосенсорів базується на вимірюванні ємності подвійного шару на межі розділу електрод / електроліт і діелектричних властивостях мембран. Подібні

датчики використовуються в деяких імуносенсорах, де зв'язування антитіл та антигенів призводить до зменшення діелектричної постійної приповерхневої зони.

Кондуктометричні перетворювачі реєструють зміну провідності розчину в біоселективній мембрані і тим самим дозволяють спостерігати за ходом біохімічних реакцій, у тому числі ферментативних. Для ферментативних реакцій зміна провідності може бути обумовлена декількома факторами – утворенням іонних груп, поділом різних зарядів, міграцією протонів, зміною ступеня асоціації іонів і зміною розмірів заряджених груп. Оскільки іони Гідрогену та гідроксид-іони характеризуються надзвичайно високою рухливістю, що пов'язано з особливостями їх переміщення в водному розчині, кондуктометричні біосенсиори фактично вимірюють зміну рН розчину в ході перебігу ферментативної реакції [14,15].

Біосенсиори на основі вимірів електрохімічного імпедансу фіксують зміну амплітуди та частоти змінного струму зарядження поверхневого шару при накладенні високочастотної змінної напруги [16]. Проходження біохімічних процесів змінює характеристики електрохімічного імпедансу в результаті перерозподілу заряду поверхневого шару або його проникності для індикаторних іонів розчину. Сенсиори цього типу використовуються для вивчення процесів електрополімеризації, корозії металів, реєстрації білків та нуклеотидів в ДНК-сенсорах та антитіл в імуносенсорах.

Висновки. Популярність електрохімічних ферментативних біосенсорів та необхідність їх подальшого розвитку та вдосконалення обумовлена наступними обставинами:

- електрохімічні методи детекції аналітичних сигналів дають можливість поліпшувати характеристики ферментативних методів в цілому і вдосконалювати конструкцію ферментативних біосенсорів;

- застосування стандартних електрохімічних методів реєстрації сигналу дозволяє скоротити витрати на підготовчій стадії досліджень, уніфікувати вимірювання і в подальшому інтегрувати біохімічні методи аналізу в існуючі системи автоматичного контролю;

- завдяки детально розробленій теорії електродних реакцій і методів електроаналізу значно полегшується розуміння закономірностей формування аналітичного сигналу з використанням ферментативних електродів;

- оскільки методи електроаналізу є універсальними, частина їх (визначення рН, концентрації деяких низькомолекулярних речовин) може бути використана для визначення активності ряду ферментів одночасно за однакових умов проведення дослідів.

Список використаної літератури

1. Будников Г.К. Основы современного электрохимического анализа / Г.К Будников., В.Н.Майстренко, М.Р. Вяселев. – М.: Мир, БИНОМ, 2003. – 592 с.
2. Grieshaber D. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures / D.Grieshaber, R.MacKenzie, J. Vörös, E.Reimhult, J. Octa // Biosci. – 2013. – Vol. 1(2). – P. 147-150.
3. Pohanka M. Electrochemical biosensors – principles and applications / M. Pohanka, P. Skládal // J. Appl. Biomed. – 2008. – № 6. – P. 57–64.

4. Bunyakul N. Combining Electrochemical Sensors with Miniaturized Sample Preparation for Rapid Detection in Clinical Samples / N.Bunyakul, A.Baеumner // *Sensors*. – 2015. – № 15(1). – P. 547-564.
5. Rogers K. Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring / K. Rogers // *Analytica Chimica Acta*, – 2006. – Vol. 568, № 1-2. – P. 222-231.
6. Castillo J. Biosensors for life quality: Design, development and applications / J.Castillo, S.Gaspar, S.Leth, M.Niculescu, A.Mortari // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2004. – Vol. 102, № 2. – P. 179-194.
7. Velasco-Garcia M. Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects / M.Velasco-Garcia // *Developmental Biology*. – 2009. – V. 20, № 1. – P. 27-33.
8. Crespilho F., Ghica M., Florescu M., Nart F., Oliveira O. A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator // *Electrochemistry Communications*. – 2006. – №8. – P. 1665-1670.
9. Chen L. Electron transfer properties and electrocatalytic behavior of tyrosinase on ZnO nanorod / L.Chen, B.Gu, G.Zhu, Y.Wu, S.Liu // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2008. – № 617. – P. 7-13.
10. Lieberzeit, P. Sensor technology and its application in environmental analysis / P. Lieberzeit, F.Dickert // *Anal Bioanal Chem*. – 2007. – Vol. 387. – P. 237-247.
11. Dzyadevych S. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future / S. Dzyadevych, V.Arkhypova, A.Soldatkin, A.El'skaya, C.Martelet // *IRBM*. – 2008. – Vol. 29. – № 171-180.
12. Hayat A. Current Trends in Nanomaterial - Based Amperometric Biosensors / A.Hayat, G.Catanante, J.Marty // *Sensors*. – 2014. – № 14(12). – P. 23439-23461.
13. Justino C., Rocha-Santos T., Duarte A. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications / C.Justino, T.Rocha-Santos, A.Duarte // *Trends in Analytical Chemistry*. – Vol. 29, № 10. – P. 1172-1183.
14. Maffrezic-Renault N. Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring/ N. Maffrezic-Renault, S.Dzyadevych // *Sensors*. – 2008. – № 8. – P. 2569-2588.
15. Berezhet'skyy L. Development of Conductometric Biosensors Based on Alkaline Phosphatases for the Water Quality Control / L.Berezhet'skyy, C.Durrieu, H.Nguyen-Ngoc, J.Chovelon, S.Dzyadevych // *Biopolymers and Cell*. – 2007. – № 23. – P. 511-518.
16. Huang Y. Impedance Biosensor for Peanut Protein Ara / Y.Huang, C.Suni, I.Ian // *Analytical Chemistry*. – 2008. – № 80 (23). – P. 9157-9161.

References

1. Byd'nikov G.K., Maystrenko V.N., Vyaselev M.R. *Osnovi sovremennogo elektrokhimicheskogo analiza [Foundations of modern electrochemical analysis]*. Moscow: Mir, BINOM Publ., 2003, 592 p. (in Russian).
2. Grieshaber D., MacKenzie R., Voros J., Reimhult E., Octa J.. *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*. Biosciences, 2013, vol. 1, no 2, pp. 147-150.
3. Pohanka M., Skládal P. Electrochemical biosensors – principles and applications *Journal of Applied Biomedicine*, 2008, no 6, pp. 57-64.

4. Bunyakul N., Baeumner A. Combining Electrochemical Sensors with Miniaturized Sample Preparation for Rapid Detection in Clinical Samples. *Sensors*, 2015, vol. 15, no 1, pp. 547-564.
5. Rogers K. Recent advances in biosensor techniques for environmental monitoring. *Analytica Chimica Acta*, 2006, vol. 568, no. 1-2, pp. 222-231.
6. Castillo J., Gaspar S., Leth S., Niculescu M., Mortari A. Biosensors for life quality: Design, development and applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2004, vol. 102, no. 2, pp. 179-194.
7. Velasco-Garcia M. Optical biosensors for probing at the cellular level: A review of recent progress and future prospects. *Developmental Biology*, 2009, vol. 20, no 1, pp. 27-33.
8. Crespilho F., Ghica M., Florescu M., Nart F., Oliveira O. A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. *Electrochemistry Communications*, 2006, no. 8, pp. 1665-1670.
9. Chen L., Gu B., Zhu G., Wu Y., Liu S. Electron transfer properties and electrocatalytic behavior of tyrosinase on ZnO nanorod. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2008, vol. 617, pp. 7-13.
10. Lieberzeit P., Dickert F. Sensor technology and its application in environmental analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, v. 387, pp. 237-247.
11. Dzyadevych S., Arkhypova V., Soldatkin A., El'skaya A., Martelet C. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future. *IRBM*, 2008, vol. 29, pp. 171-180.
12. Hayat A., Catanante G., Marty J. Current Trends in Nanomaterial - Based Amperometric Biosensors. *Sensors*, 2014, vol. 14, no. 12, pp. 23439-23461.
13. Justino C., Rocha-Santos T., Duarte A. Review of analytical figures of merit of sensors and biosensors in clinical applications. *Trends in Analytical Chemistry*, 2013, vol. 29, no. 10, pp. 1172-1183.
14. Maffrezic-Renault N., Dzyadevych S. Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring. *Sensors*, 2008, no. 8, pp. 2569-2588.
15. Berezhetsky L., Durrieu C., Nguyen-Ngoc H., Chovelon J., Dzyadevych S. Development of Conductometric Biosensors Based on Alkaline Phosphatases for the Water Quality Control. *Biopolymers and Cell*, 2007, no. 23, pp. 511-518.
16. Huang Y., Suni C., Ian I. Impedance Biosensor for Peanut Protein Ara. *Analytical Chemistry*, 2008, no. 80(23), pp. 9157-9161.

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ БИОСЕНСОРЫ **КИСЛОВА О.В.**

Киевский национальный университет технологий и дизайна

Цель. Охарактеризовать современные электрохимические биосенсоры различного типа действия, сравнить принципы их работы, особенности применения каждого типа биосенсоров, обобщить методы повышения селективности и чувствительности биосенсоров, дальнейшие перспективы развития.

Методика. Аналитические методы сравнения принципов действия электрохимических ферментативных биосенсоров различного типа.

Результаты. Проведенные исследования показали преимущества и недостатки ферментативных биосенсоров, особенности электрохимических превращений, лежащих в основе их действия.

Научная новизна. На основе исследования электрохимического механизма действия различных типов биосенсоров выделены возможные направления дальнейшего их совершенствования.

Практическая значимость. Обобщены факторы, необходимые для создания высокоэффективных современных биоаналитических приборов: выбор материала электрода, подготовка фермента, создание условий для повышения чувствительности приборов путем предварительного накопления аналита у индикаторного электрода или на нем; совершенствование электрохимических измерений.

Ключевые слова: биосенсоры электрохимические, ферментативные, потенциометрические, амперометрические, кондуктометрические.

ELECTROCHEMICAL ENZYMATIC BIOSENSORS

KISLOVA O.

Kyiv National University of Technologies and Design

Purpose. To characterize modern electrochemical enzymatic biosensors of different action types, compare the principles of their work, each type of biosensor application features, summarize methods to improve selectivity and sensitivity of the biosensors, future prospects of their development.

Methods. Analytical methods of action principles comparison of the various types electrochemical enzyme biosensors.

Results. Studies have demonstrated the advantages and disadvantages of enzymatic biosensors, especially electrochemical reactions that underlie their action.

Scientific novelty. Showing possible way's of enzymatic biosensors further improvement based on electrochemical studies of their action mechanism.

Practical significance. Given necessary factors for the creation of highly advanced bioanalytical instruments: the choice of the electrode material, the preparation of the enzyme, to create conditions for increasing the sensitivity of the instrument by the prior accumulation of the analyte from the indicator electrode or on it; improving electrochemical measurements.

Keywords: biosensors electrochemical, enzymatic, potentiometric, amperometric, conductometric.