

УДК: 543.555+544.475

КОНДУКТОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ АЦЕТИЛХОЛІНЕСТЕРАЗИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КАТІОННИХ ПОВЕРХНЕВО- АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ВОДНИХ РОЗЧИНАХ

І. С. Кучеренко^{1,2}
О. О. Солдаткін¹
В. М. Архипова¹
С. В. Дзядевич^{1,3}
О. П. Солдаткін^{1,3}

¹Лабораторія біомолекулярної електроніки,
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ
²Інститут біології Київського національного університету
імені Тараса Шевченка
³Інститут високих технологій Київського національного
університету імені Тараса Шевченка

E-mail: austrb@rambler.ru

Екологічний моніторинг довкілля набуває дедалі більшого значення. Тому за токсичними речовинами у навколишньому середовищі потрібен постійний контроль. Одними з небезпечних забруднювачів довкілля є поверхнево-активні речовини. Нами розроблено кондуктометричний біосенсор для визначення їх у водних розчинах. Як кондуктометричний перетворювач використовували диференційну пару планарних тонкоплівчастих гребінчастих електродів, нанесених на керамічну підкладку. Біоселективним елементом слугувала ацетилхолінестераза, іммобілізована разом із сироватковим альбуміном бика на поверхню перетворювача за допомогою глутарового альдегіду. Підібрано оптимальні умови іммобілізації ацетилхолінестерази в парах глутарового альдегіду. Вивчено вплив характеристик дослідженого розчину (іонна сила, рН та буферна ємність) на роботу біосенсора, перевірено його чутливість до бензалконіуму хлориду. Показано, що біосенсор характеризується високою операційною стабільністю. За допомогою створеного кондуктометричного біосенсора на основі ацетилхолінестерази можна визначати концентрації поверхнево-активних речовин у водних зразках.

Ключові слова: кондуктометричний біосенсор, ацетилхолінестераза, поверхнево-активні речовини, інгібіторний аналіз, екологічний моніторинг.

У наш час екологічний моніторинг довкілля набуває дедалі більшого значення. Передусім потрібен постійний контроль наявності токсичних речовин у навколишньому середовищі. Одними з небезпечних забруднювачів довкілля є поверхнево-активні речовини (ПАР).

ПАР — це група хімічних сполук, об'єднаних здатністю зменшувати поверхневий натяг на межі розподілу двох фаз. Завдяки своїм властивостям ПАР широко застосовуються в промисловості та побуті. Вони входять до складу різноманітних мийних та дезінфікуючих розчинів, засобів особистої гігієни тощо. Після використання ПАР у великих кількостях потрапляють у навколишнє середовище, забруднюючи водні екосистеми [1–3]. Небезпеку також становить здатність ПАР підвищувати розчинність інших токсичних речовин, що призводить до збільшення їхньої концентрації у воді [4]. Усе це свідчить про необхідність постійного контролю наявності цих шкідливих речовин у навколишньому середовищі.

На цей час основними методами визначення ПАР є рідинна хроматографія, спектрометрія, спектрофлуориметрія, колориметрія, двофазне титрування [5, 6]. Однак ці методи мають низку недоліків. Деякі з них потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання. А проведення аналізу передбачає складну попередню підготовку проб, що вимагає великих затрат часу та коштів. Тому сьогодні вкрай актуальним є створення більш зручного, точного, селективного, швидкого та дешевого методу визначення ПАР.

Розроблення та створення біосенсорів для визначення ПАР може якнайкраще вирішити проблеми, пов'язані з переліченими вище недоліками, та задовольнити усім вищезазначеним вимогам.

На сьогодні існує кілька варіантів біосенсорів для визначення ПАР. В одному з цих біосенсорів як біоселективний матеріал використовували іммобілізовані на поверхню амперометричного перетворювача клітини

Trichosporon cutaneum [7]. В інших варіантах біосенсорів у складі чутливого елемента були присутні клітини інших видів — *Pseudomonas rathonis* [8], *Comamonas testosteroni* [4] та *Lactobacillus plantarum* [3]. Однак усі відомі біосенсиори для визначення ПАР розроблено на основі мікроорганізмів. Відповідно, порівняно з біосенсорами на основі ензимів вони мають недоліки, зокрема недостатню чутливість та селективність. Крім того, біосенсиори на основі бактерій дуже складно стандартизувати.

Цю роботу присвячено розробленню ензимного кондуктометричного біосенсора на основі ацетилхолінестерази для інгібіторного аналізу поверхнево-активних речовин.

Матеріали і методи

У роботі використовували ензим ацетилхолінестеразу (АХЕ) з *Electrophorus electricus* (ЕС 3.1.1.7) активністю 425,94 од. акт./мг, фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина). Сироватковий альбумін бика (БСА, фракція V), 50%-й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) та ацетилхоліну хлорид (субстрат ацетилхолінестерази) — також фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина). Інгібітором слугувала катіонна ПАР — бензалконіуму хлорид фірми Fluka (Швеція). Сполуки для приготування буфера та інші неорганічні речовини, використовувані в роботі, були вітчизняного виробництва і мали ступінь чистоти «х. ч.» та «ч. д. а.».

Кондуктометричні перетворювачі виготовлено згідно з нашими рекомендаціями в Інституті фізики напівпровідників імені В. Є. Лашкарьова (Київ). Вони мають розмір 5×30 мм і складаються з двох пар ідентичних золотих гребінчастих електродів, нанесених на керамічну основу. Кондуктометричні перетворювачі під'єднували до вимірювальної установки, яку детально описано в попередніх роботах [9, 10].

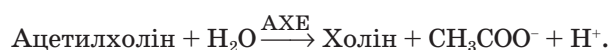
Для виготовлення робочих біоселективних мембран використовували такий розчин: 10%-на ацетилхолінестераза, 10%-й БСА та 20%-й гліцерол у 40 мМ фосфатному буфері; рН 6,5. Суміш для приготування референтної мембрани готували так само, але замість ензиму брали тільки БСА з кінцевою концентрацією 20%. Після нанесення розчинів на робочі поверхні кондуктометричних перетворювачів їх розміщували у насичених парах глутарового альдегіду на 35 хв, а потім витримували 15 хв на повітрі за кімнатної температури. Після цього перетворювачі занурювали у робочий буфер на

20–30 хв для вимивання незв'язаного ензиму та надлишку глутарового альдегіду.

Виміри проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, за кімнатної температури, у відкритій комірці об'ємом 2 мл за постійного перемішування. Концентрацію субстратів та інгібіторів у робочій комірці задавали, додаючи до комірки концентровані розчини цих речовин. Усі дослідження проводили у двох-трьох серіях. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища, електричними перешкодами, усували, використовуючи в роботі диференційний режим вимірювань.

Результати та обговорення

В основі роботи біосенсора лежить ензиматична реакція, що відбувається в мембрані з ацетилхолінестеразою, нанесеною на поверхню кондуктометричного перетворювача:



У процесі проходження ензиматичної реакції ацетилхолінестераза розщеплює ацетилхолін на холін та оцтову кислоту. Оцтова кислота дисоціює, при цьому збільшується концентрація іонів у робочій мембрані. Це спричинює зміну провідності розчину, яку реєструє кондуктометричний перетворювач [11].

У разі інгібування ензиму ПАР зменшується кількість іонів, які утворюються в результаті ензиматичної реакції, що призводить до зменшення відгуку біосенсора. Залежно від швидкості зменшення відгуку біосенсора можна визначати концентрацію ПАР у розчині.

Першим етапом роботи було визначення оптимальних умов іммобілізації ацетилхолінестерази на поверхню біосенсора. Для цього було підібрано оптимальний час іммобілізації ацетилхолінестерази в насичених парах ГА. На рис. 1 наведено результати дослідження активності ензимних мембран біосенсорів, іммобілізованих в парах ГА за різного часу — від 15 до 65 хв. Найвищу і майже однакову чутливість біосенсорів до ацетилхоліну спостерігали при 35- та 65-хвилинній іммобілізації в парах ГА. Однак час відгуку біосенсора за іммобілізації 65 хв був у кілька разів довший, ніж за 35-хвилинної іммобілізації, тому для подальших експериментів обрали час іммобілізації біосенсорів саме 35 хв.

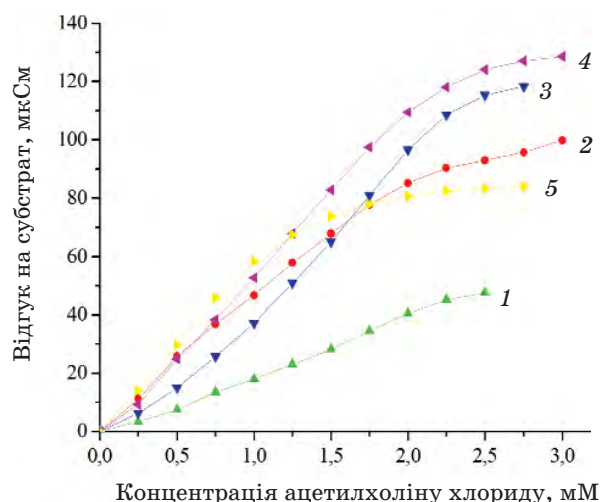


Рис. 1. Вплив тривалості (1 — 15 хв, 2 — 25 хв, 3 — 35 хв, 4 — 65 хв, 5 — 120 хв) іммобілізації ацетилхолінестерази в парах ГА на величину сигналу біосенсора залежно від концентрації субстрату. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, pH 6,5

Після визначення оптимальних умов іммобілізації ацетилхолінестерази потрібно було відпрацювати методику проведення експериментів з інгібування біоселективного елемента біосенсора ПАР. Було вирішено додавати ПАР та ацетилхоліну хлорид до вимірювальної комірки різними способами. Для підтвердження вибору методики проведення інгібування було виконано експерименти для трьох концентрацій субстрату, які знаходяться на різних ділянках калібрувальної кривої розробленого біосенсора.

Застосовували такі методики:

1. Отримували відгук біосенсора на субстрат, а потім додавали ПАР. Сигнал поступово зменшувався до 5 — 90% від максимального залежно від концентрації ПАР. Інгібування відбувалось у середньому за 70 хв. Недолік методики — довготривалий аналіз.

2. Спочатку біосенсор інкубували у водному розчині ПАР упродовж 70 хв, після чого отримували відгук біосенсора на субстрат. Біосенсорний відгук становив ті самі 5–90% від відгуку на субстрат до інгібування (результати збігалися з результатами, одержаними за першою методикою). Недолік методики — довготривалий аналіз.

3. Отримували відгуки біосенсора, додаючи суміш ПАР із субстратом. Зменшення сигналу (залишкова активність) було також пропорційне концентрації інгібітора (рис. 2) за відносно нетривалого часу аналізу, але чутливість біосенсора до ПАР була меншою, ніж у перших двох методиках. За 100% було прийнято величину відгуку біосенсора на додавання чистого субстрату.

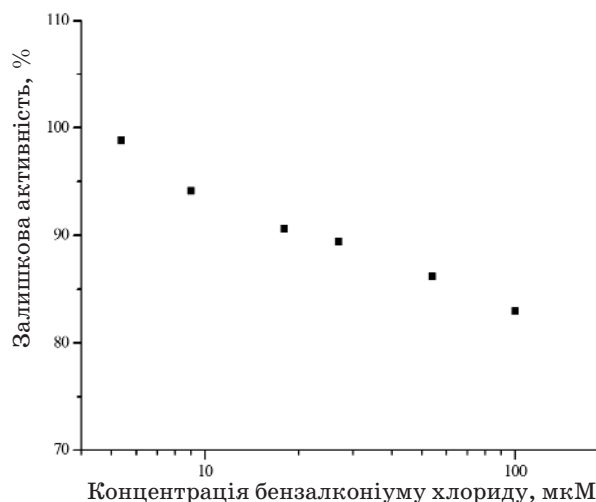


Рис. 2. Залежність залишкової активності біоселективного елемента від концентрації бензалконіуму хлориду при додаванні його в комірку в суміші з 3 мМ ацетилхоліну хлоридом. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, pH 6,5

Недолік методики — недостатня чутливість біосенсора до ПАР. Межа визначення — 5 мкМ.

4. Остання методика дуже схожа з першою: ПАР вносили в комірку після додавання субстрату та отримання максимального відгуку, але детекцію вже проводили не за оцінкою величини зменшення відгуку, а за швидкістю інгібування.

На рис. 3 наведено реальний приклад експерименту з інгібіторного аналізу за допомогою останньої методики. Спочатку одержували відгук на насичувальну концентрацію субстрату, після чого додавали ПАР і спостерігали падіння сигналу, зумовлене інгібуванням ензиму. За різних концентрацій ПАР швидкість інгібування біоселективного елемента (мкСм/хв) відрізняється, що дає змогу отримати калібрувальні графіки для визначення ПАР у досліджуваному зразку.

Переваги методики: найменша мінімальна концентрація визначення бензалконіуму хлориду — 1 мкМ (0,35 мг/л); тривалість аналізу — до 10 хв; досить широкий для ПАР концентраційний діапазон визначення біосенсора.

Таким чином, було вирішено надалі використовувати останню (четверту) методику визначення ПАР за допомогою розробленого біосенсора, за якої ПАР додавали в комірку після внесення субстрату, а детекцію проводили не за стаціонарним зменшенням величини відгуку, а за швидкістю інгібування.

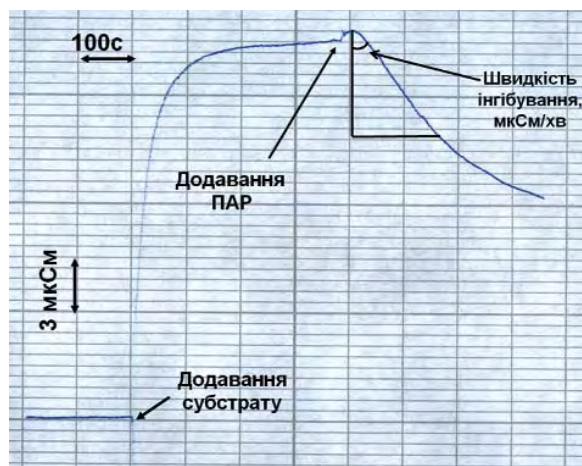


Рис. 3. Варіант методики визначення ПАР оцінюванням швидкості інгібування ацетилхолінестерази біоселективного елемента біосенсора (четверта методика) на реальному прикладі проведення експерименту.

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, концентрація субстрату в комірі — 3 мМ

Відомо, що параметри роботи біосенсора можуть залежати як від його власних характеристик, так і від розчину, в якому проводять вимірювання. Тому наступним етапом нашої роботи було дослідження впливу параметрів розчину, таких як буферна ємність, рН та іонна сила, на величину відгуку ацетилхолінестеразного біосенсора і на швидкість інгібування біоселективного елемента ПАР.

На рис. 4 показано залежність відгуку розробленого біосенсора на субстрат та швидкість його інгібування ПАР (бензалконіуму хлорид) від концентрації робочого буферного розчину. З графіка видно, що з підвищенням концентрації буфера від 1 до 20 мМ істотно зменшується як величина відгуку біосенсора, так і швидкість його інгібування. У подальших експериментах використовували концентрацію буфера 5 мМ, за якої залишається значна буферна ємність робочого розчину, спостерігаються високі відгуки біосенсора на субстрат і достатня швидкість інгібування ензиму поверхнево-активними речовинами.

Як відомо, внаслідок іммобілізації ензиму може змінюватись рН-оптимум його роботи. Тому було досліджено вплив рН розчину на роботу кондуктометричного біосенсора. Під час проведення цього експерименту застосовували універсальний буфер, що має однакову буферну ємність у широкому діапазоні значень рН. Оптимум біосенсорного визначення субстрату спостерігається за рН 6,5, а найвища швидкість інгібування біоселек-

тивного елемента ПАР — за рН 6,0 (рис. 5). Тому в подальших експериментах ми вирішили використовувати буфер з рН 6,0, за якого спостерігаються достатньо високі відгуки на субстрат та найвища швидкість інгібування біосенсора поверхнево-активними речовинами.

Ще однією характеристикою буферного

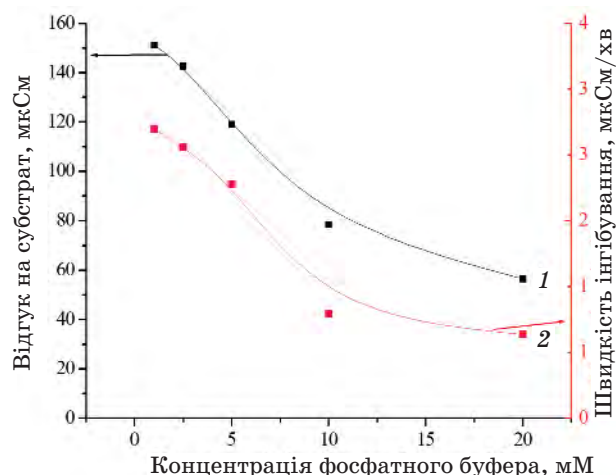


Рис. 4. Залежність величини відгуку біосенсора на субстрат (1) та швидкості інгібування ацетилхолінестерази поверхнево-активними речовинами (2) від концентрації буферного розчину.

Вимірювання проводили у фосфатному буфері, рН 6,5, концентрація ацетилхоліну хлориду — 3 мМ, бензалконіуму хлориду — 25 мкМ

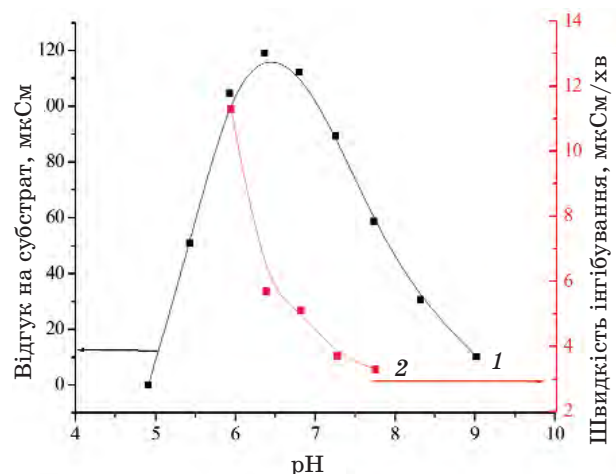


Рис. 5. Залежність величини відгуку біосенсора на субстрат (1) та швидкості його інгібування бензалконіуму хлоридом (2) від рН робочого буферного розчину.

Вимірювання проводили в універсальному буфері, концентрація ацетилхолінхлориду — 3 мМ, бензалконіуму хлориду — 25 мкМ

розчину, що може впливати на роботу біосенсора, є іонна сила. Дослідження цього впливу показало, що підвищення іонної сили розчину значно зменшує як величину відгуку на субстрат, так і швидкість інгібування біосенсора ПАР (рис. 6). Зважаючи на це, потрібно постійно контролювати іонну силу під час роботи з реальними зразками довокілья.

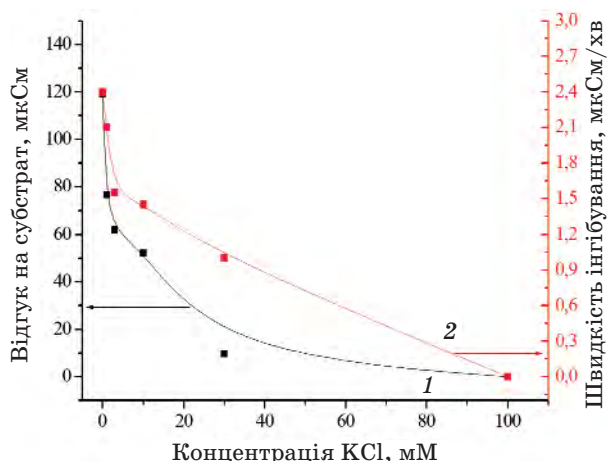


Рис. 6. Залежність величини відгуку біосенсора на субстрат (1) та швидкості інгібування біоселективного елемента бензалконіуму хлоридом (2) від іонної сили розчину.

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,0, концентрація субстрату — 3 мМ, бензалконіуму хлориду — 25 мкМ

Аналізуючи отримані дані щодо впливу характеристик розчину на роботу біосенсора під час прямого та інгібіторного аналізів, було вирішено використовувати 5 мМ фосфатний буфер, рН 6,0, та постійно контролювати іонну силу.

За оптимальних умов роботи біосенсора було досліджено залежність швидкості інгібування біоселективного елемента від концентрації бензалконіуму хлориду (рис. 7).

Одними з найважливіших характеристик кожного біосенсора є операційна стабільність та відтворюваність сигналу. Тому на наступному етапі нашої роботи було перевірено операційну стабільність розробленого біосенсора. Результати дослідження подано на рис. 8.

Біосенсор характеризувався високою відтворюваністю сигналів як за прямого визначення основного субстрату — ацетилхоліну, так і в разі інгібіторного визначення ПАР (рис. 8). Стандартне відхилення (Sd)

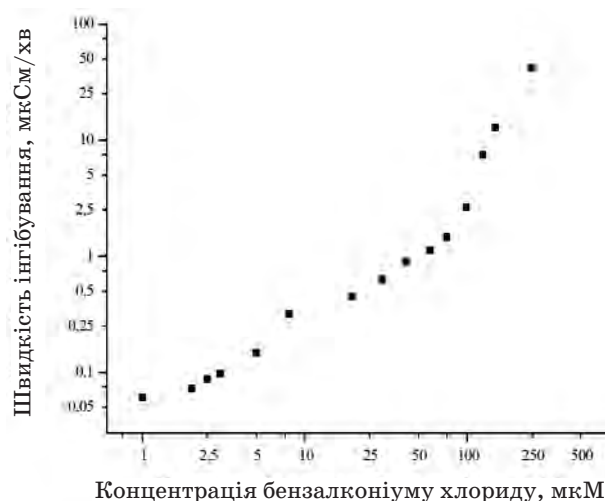


Рис. 7. Калібрувальний графік для визначення концентрації бензалконіуму хлориду в логарифмічному масштабі.

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,0, концентрація субстрату — 3 мМ

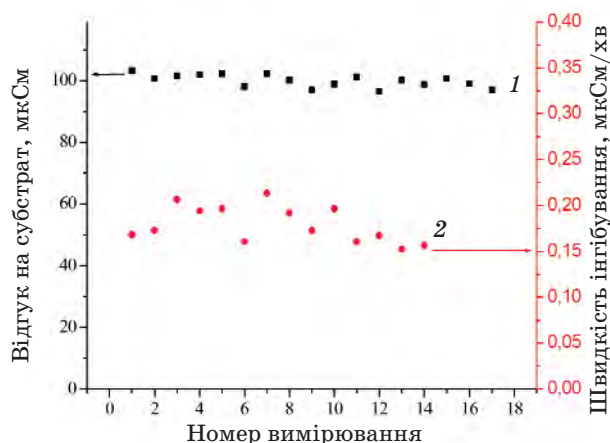


Рис. 8. Відтворюваність сигналів біосенсора при визначенні ацетилхоліну (1) та ПАР (2).

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,0, концентрація субстрату — 3 мМ, концентрація інгібітора — 25 мкМ

для визначення ацетилхоліну становило $\pm 1,9\%$, а для визначення бензалконіуму хлориду — $\pm 11\%$.

Таким чином, уперше розроблено кондуктометричний біосенсор на основі іммобілізованої ацетилхолінестерази для визначення ПАР. Оптимальний час іммобілізації ацетилхолінестерази в БСА-матриці в парах глутарового альдегіду — 35 хв. Було перевірено декілька варіантів інгібіторного визначення ПАР і за допомогою оптимальної

методику перевірено чутливість біосенсора до різних концентрацій бензалконіуму хлориду. Визначено рН-оптимум роботи створеного кондуктометричного біосенсора, який становить 6,0. Проаналізовано вплив іонної сили та буферної ємності на чутливість біосенсора до субстрату та інгібітора, вибрано оптимальний склад і концентрацію робочого буфера. Показано, що розроблений біосенсор характеризується високою відтворюваністю сигналів як за прямого визначення основного субстрату — ацетилхоліну, так і в разі інгібіторного — бензалконіуму хлориду.

Запропонований кондуктометричний ензимний біосенсор надалі може бути використаний для експрес-аналізу вмісту ПАР у реальних зразках довкілля.

Автори вдячні за фінансову підтримку від НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб». Також автори статті висловлюють щирі вдячності за фінансову підтримку УНТЦ в рамках проекту № 4591 «Development of enzyme multisensor arrays for ecological monitoring of toxins».



Кондуктометричний біосенсор на основі ацетилхолінестерази

ЛІТЕРАТУРА

1. Taranova L., Semenchuk I., Manolov T. et al. Bacteria-degraders as the base of an amperometric biosensor for detection of anionic surfactants // *Biosens. Bioelectr.* — 2002. — V. 17. — P. 635–640.
2. Perez L., Pinazo A., Garcia M. T. et al. Cationic surfactants from lysine: Synthesis, micellization and biological evaluation // *Eur. J. Med. Chem.* — 2009. — V. 44. — P. 1884–1892.
3. Seki A., Tokita K. Surfactant cytotoxicity assay based on a silicon transducer // *Chemosphere.* — 2009. — V. 76. — P. 341–344.
4. Taranova L., Fesay A., Ivashchenko G. et al. *Comamonas testosteroni* strain TI as a potential base for a microbial sensor detecting surfactants // *Appl. Biochem. Microbiol.* — 2004. — V. 40. — P. 404–408.
5. Madunic-Cacic D., Sak-Bosnar M., Galovic O. et al. Determination of cationic surfactants in pharmaceutical disinfectants using a new sensitive potentiometric sensor // *Talanta.* — 2008. — V. 76. — P. 259–264.
6. Merino F., Rubio S., Perez-Bendito D. Mixed aggregate-based acid-induced cloud-point extraction and ion-trap liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of cationic surfactants in sewage sludge // *J. Chromatogr. A.* — 2003. — V. 998. — P. 143–154.
7. Nomura Y., Ikebukuro K., Yokoyama K. et al. Application of a linear alkylbenzene sulfonate biosensor to river water monitoring // *Biosens. Bioelectr.* — 1998. — V. 13. — P. 1047–1053.
8. Reshetilov A., Semenchuk I., Iliasov P., Taranova L. The amperometric biosensor for detection of sodium dodecyl sulfate // *Anal. Chim. Acta.* — 1997. — V. 347. — P. 19–26.
9. Дзядевич С. В., Шульга А. А., Пацковский С. В. и др. Тонкопленочные кондуктометрические датчики для ферментативных биосенсоров // *Электрохимия.* — 1994. — Т. 30. — С. 982–987.
10. Солдаткін О. О., Сосовська О. Ф., Бенілова І. В. та ін. Ензимний кондуктометричний сенсор для визначення концентрації формальдегіду у модельних зразках // *Біополімери і клітина.* — 2005. — Т. 21. — С. 425–432.
11. Дзядевич С. В. Кондуктометричні ферментні біосенсиори: теорія, технологія, застосування // *Там само.* — 2005. — Т. 21. — С. 91–106.

КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАТИОННЫХ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

И. С. Кучеренко^{1,2}, А. А. Солдаткин¹,
В. Н. Архипова¹, С. В. Дзядевич^{1,3},
А. П. Солдаткин^{1,3}

¹Лаборатория биомолекулярной электроники,
Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

²Институт биологии Киевского
национального университета
имени Тараса Шевченко

³Институт высоких технологий
Киевского национального университета
имени Тараса Шевченко

E-mail: austrb@rambler.ru

Экологический мониторинг окружающей среды приобретает все большее значение. Поэтому за токсичными веществами в окружающей среде необходим постоянный контроль. Одними из опасных загрязнителей окружающей среды являются поверхностно-активные вещества. Нами разработан кондуктометрический биосенсор для определения этих веществ в водных растворах. В качестве кондуктометрического преобразователя использовали дифференциальную пару планарных тонкопленочных гребенчатых электродов, нанесенных на керамическую подложку. Биоселективным элементом служила ацетилхолинэстераза, иммобилизованная вместе с сывороточным альбумином быка на поверхность преобразователя с помощью глутарового альдегида. Были подобраны оптимальные условия иммобилизации ацетилхолинэстеразы в парах глутарового альдегида. Исследовано влияние характеристик раствора (ионная сила, pH и буферная емкость) на работу биосенсора, проверена его чувствительность к бензалкония хлориду. Показано, что биосенсор характеризуется высокой операционной стабильностью. С помощью созданного кондуктометрического биосенсора на основе ацетилхолинэстеразы можно определять концентрацию поверхностно-активных веществ в водных образцах.

Ключевые слова: кондуктометрический биосенсор, ацетилхолинэстераза, поверхностно-активные вещества, ингибиторный анализ, экологический мониторинг.

CONDUCTOMETRIC BIOSENSOR BASED ON ACETYLCHOLINESTERASE FOR CATIONIC SURFACTANTS DETECTION IN WATER SOLUTIONS

I. S. Kucherenko^{1,2}, O. O. Soldatkin¹,
V. M. Arkhypova¹, S. V. Dzyadevych^{1,3},
A. P. Soldatkin^{1,3}

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

²Institute of Biology, Taras Shevchenko
National University of Kyiv

³Institute of High Technologies, Taras
Shevchenko National University of Kyiv

E-mail: austrb@rambler.ru

At the moment the ecological monitoring of environment took on special significance. Permanent control of presence of toxic matters is foremost needed in an environment. One of dangerous toxicants of environment are surfactants. Conductometric biosensor for determination of surfactants has been developed for the first time. As a conductometric transducer we used a differential pair of the planar thin-film interdigitated electrodes deposited on the ceramic substrate. As bioselective element we used acetylcholinesterase immobilized together with bovine serum albumin on the transducer's surface by using glutaraldehyde. The optimal conditions for the acetyl cholinesterase immobilization in glutaraldehyde vapour were determined. Influence of characteristic of solution (ionic strength, pH and buffer capacity) on the work of developed biosensor was investigated. The biosensor's sensitivity to benzalkonium chloride was tested. Good operational stability of the biosensor for determination of surfactants was shown. The possibility for determination of surfactant concentration in the water samples by using developed conductometric biosensor based on acetylcholinesterase was shown.

Key words: conductometric biosensor, acetylcholinesterase, surfactants, inhibitory analysis, environmental monitoring.