

Биоэлектрохимические свойства проводящих матриц «фермент/полиэлектролиты/многостенные углеродные нанотрубки»

Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Решетилов А.Н.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН,
г. Пушкино; plekhanova@ibpm.pushchino.ru

Одной из задач биотехнологии является эффективная и надежная иммобилизация ферментов на твердых подложках. Для сохранения активности ферментов на высоком уровне в течение длительного времени может использоваться метод капсулирования. Мультислойная мембрана оказывает защищающее действие на объекты, находящиеся внутри капсулы, что позволяет использовать их в качестве микроконтейнеров и микрореакторов в фармацевтической, косметической, пищевой, текстильной и сельскохозяйственной промышленности. Капсулы, содержащие ферменты, могут быть использованы для создания биосенсоров и биотопливных элементов. Модификация капсул наноматериалами, например, многостенными углеродными нанотрубками (МУНТ) будет приводить к изменению их электрохимических свойств.

Целью данной работы являлось исследование изменений биоэлектрохимических свойств мультислойных полиэлектролитных проводящих матриц в виде микрокапсул, содержащих фермент, при модификации их многостенными углеродными нанотрубками. Как модельный объект использовали глюкозооксидазу (ГОД) и мембранные фракции (МФ) клеток *Gluconobacter oxydans* sbsp. *industrius* ВКМ В-1280.

Измерения выполняли на 3-контактных электродах, полученных матричной печатью (ООО «КолорЭлектроникс», Москва, Россия). Использовали глюкозооксидазу из *Aspergillus niger*, с активностью 185000 U/г/. Полиэлектролитные микрокапсулы (ПМК) с ферментом иммобилизовали сорбцией на поверхности графитового электрода. Концентрация фермента на поверхности электрода составляла 139 мкг/см². Между измерениями готовые биосенсоры хранили при температуре 4°C в темноте. Измерения выполняли при температуре 200 С в кювете объемом 1 мл при постоянном перемешивании. рН, молярность и концентрацию NaCl в буферном растворе варьировали. Вольтамперометрические и импедансные измерения проводили в присутствии 5 мМ феррицианида калия. Проводили сравнение свойств проводящих матриц, модифицированных и не модифицированных углеродными нанотрубками и ферментом.

Внешний вид проводящих матриц, содержащих фермент, был изучен с помощью методов атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопии. Было показано, что размер единичной микрокапсулы составлял 2,8±0,5 мкм, при этом капсулы склонны к небольшой конъюгации. Единичная микрокапсула состояла из шести слоев противоположно заряженных полиэлектролитов, каждый из которых был толщиной около 6 нм.

Электрохимические свойства проводящей матрицы исследовали с помощью метода электрохимической импедансной спектроскопии. Состав раствора в измерительной ячейке оставался неизменным, поэтому любые изменения в импедансных спектрах были связаны лишь с модификацией поверхности электрода. Рассматривались импедансные спектры для немодифицированных электродов, а также спектры для электродов, модифицированных различными вариантами полимерных матриц с нанотрубками (ПМК с МУНТ в ядре; ПМК с МУНТ между слоями полиэлектролитов; ПМК с МУНТ и в ядре, и между слоями полиэлектролитов; ПМК, содержащие фермент и МУНТ в ядре). Значения общих сопротивлений для электродов с различными вариантами модификации поверхности представлены в таблице. Стоит отметить, что вид импедансных зависимостей электродов значительно изменялся при добавлении на их поверхность ПМК. Вместо стандартного полукруга на частотной характеристике наблюдалось два полукруга, каждый из которых

характеризовался отдельной парой из емкости и сопротивления переноса заряда. Это, скорее всего, связано с появлением дополнительной границы раздела фаз, через которую происходит перенос электронов в системе.

Табл. 1. Сопротивления электродов с различными модификациями поверхности

Графитовый электрод, модифицированный различными компонентами	Сопротивление общее, кОм
немодифицированный	4200±200
ПМК	2560±170
МУНТ	34±1
ПМК/МУНТ в ядре	172±8
ПМК/МУНТ между слоями полиэлектролитов	181±6
ПМК/МУНТ в ядре и между слоями полиэлектролитов	162±6
ГО	1200±30
ПМК с ГО	120±4
ПМК с ГО и МУНТ в ядре и между слоями полиэлектролитов	25±1

Были также исследованы циклические вольтамперометрические характеристики электродов, модифицированных различными вариантами матриц с ПМК. Наиболее значимые изменения вида кривых вольтаммограмм происходят при внесении в матрицу ПМК углеродных нанотрубок.

Верхний слой полиэлектролита, покрывающий капсулу, несет отрицательный заряд и хорошо сорбируется на поверхности графитового электрода благодаря кулоновскому взаимодействию. Для изучения возможного практического применения проводящих матриц на основе ПМК измерительные электроды предварительно модифицировали гексацианоферратом железа (берлинская лазурь) и использовали в качестве биосенсора для измерения глюкозы. Берлинская лазурь является электрокатализатором восстановления пероксида водорода, который выделяется в ходе окисления субстрата ферментом и отражает каталитическую активность иммобилизованного фермента.

Были изучены характеристики биосенсоров на основе электродов с берлинской лазурью, модифицированных полиэлектролитными капсулами с ферментом. Использовали капсулы, содержащие и не содержащие в своем составе МУНТ. Введение в состав капсул МУНТ приводит к более высокой чувствительности биосенсора (0.30 мкА/мМ против 0.05 мкА/мМ) к глюкозе при одинаковой концентрации фермента на электроде. Дополнительная модификация поверхности электрода нанотрубками приводит к еще более высоким сигналам биосенсора и значительному увеличению чувствительности (до 0.94 мкА/мМ) анализа. Такое явление связано с увеличением проводимости системы и возможностью облегченной передачи электронов по нанотрубкам на электрод от фермента через мембрану полиэлектролитных капсул, что подтверждается также импедансометрическими данными. Кроме того, при модификации нанотрубками изменяется диапазон детекции глюкозы. Нижний диапазон детекции смещается до 0.05 мМ с 1 мМ, что позволяет определять более низкие концентрации глюкозы.

Также была изучена возможность встраивания в изученные проводящие матрицы мембранных фракций уксуснокислых бактерий *Gluconobacter oxydans*, содержащих в своем составе PQQ-зависимые ферменты, в том числе глюкозо- и алкогольдегидрогеназы.

Полученные данные расширяют область применения проводящих матриц «полиэлектролиты/углеродные нанотрубки/биокатализатор» и позволяют предположить перспективность их использования в биосенсорах и биотопливных элементах.

Авторы выражают благодарность сотруднику ИБФМ РАН Мачулину А.В. за получение микрофотографий СЭМ, а также сотрудникам Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН Тихоненко С. А., Дубровскому А. В., Ким А. Л. за помощь в проведении эксперимента по капсулированию фермента.