

6. Ahmed M. E., Rathnakumar, K., Awasti, N., Elfuruk, M. S., and Hammam, A. R. A. (2021). Influence of probiotic adjunct cultures on the characteristics of low-fat Feta cheese. *Food Sci. Nutr.* 9, 1512–1520. doi: 10.1002/fsn3.2121

7. Al-Hamdani, H. M. S., Ahmed, S. H., & Khudadat, S. (2021). Developing soft cheese industry supported with medical herbs as functional food: developing soft cheese industry supported with medicinal herbs as functional food. *Iraqi Journal of Market Research and Consumer Protection*, 13(1). 2021. P.1–13

8. Orymbetova G.E., Kassymova M., Kobzhasarova Z., Abdizhapparova B.T., Abdugamitova A.E. Study of storage ability of curd dessert with addition of vegetable raw materials. *Bulletin of the Almaty Technological University - Almaty*, 2019. - No. 4 (125). - P. 24-28.

9. Gorlov I.F., Serova O.P., Vorontsova E.N. etc. Method of obtaining soft cheese. Patent RF No. 2476074. Published on February 27, 2013. No. 6 (In Russian)

10. Yurchenko N.A., Ostroumov L.A., Zakharova L.M. etc. Method of production of combined soft cheese. Patent RF No. 2289934. Published on 27.12.2006. No. 36

11. Voblikova T.V. Method of production of soft cheese. Patent RF No. 2509474. Published on March 20, 2014. No. 36 (In Russian)

12. Zhakupova G.N., Alimardanova M.K., Nurtaeva A.B., Sagandyk A.T., Erbolat T.E. Improvement of the technology of cheeses based on milk whey. *Bulletin of the Almaty Technological University*. 2022 (3). P. 40-45.

<https://doi.org/10.48184/2304-568X-2022-3-40-45> (In Russian)

13. Tuganova B.S., Isaeva K.S., Kazhibayeva G.T. The technology of soft cheese is mixed with milk of farm animals. *Bulletin of the Almaty Technological University*. 2021. (1):26-32. <https://doi.org/10.48184/2304-568X-2021-1-26-32> (In Russian)

14. Chechetkina A., Iakovchenko N. and Zabodalova L. The technology of soft cheese with a vegetable component. *J. Agronomy Research* 14(5), 1562–1572, 2016

15. Shuvarikov A. S. et al. Development of formulation for soft cheese based on milk from animals of different species. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 954 012070. 2022.

16. Sturova, Yu.G. Factors influencing the activity of enzyme preparations of animal origin // *Cheese making and maslo making*. 2014. No. 3. P. 47-49. (In Russian)

17. Valiev R.R., Ismagilova A.M., Ponomarev V.Ya. Comparative analysis of sourdough starters for cheese production // *Innovative technologies in science and education: collection of articles X International scientific and practical conference*. 2019. P. 127-129. (In Russian)

18. Avdeev A. Yu. Prospective varieties of sweet pepper / A.Yu. Avdeev, O.P. Kigashpaeva, F.K. Bajmaeva, S.T. Sisengalieva // *International Journal of Humanities and Natural Sciences*. 2017. No. 11. P. 65-68. (In Russian)

МРНТИ 65.63.03

DOI <https://doi.org/10.48184/2304-568X-2023-4-121-131>

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТЕХНОЛОГИИ LAYER-BY-LAYER ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ФЕРМЕНТНОГО БИОСЕНСОРА ИСПОЛЬЗУЕМОГО ДЛЯ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА МОЛОКА

А.К. КАКИМОВ ¹, К.С. ЖАРЫКБАСОВА ², Г.Е. ТУЛЬКЕБАЕВА ¹,

Ж.Х. КАКИМОВА ¹, Е.С. ЖАРЫКБАСОВ ¹, Г.О. МИРАШЕВА ¹, Н.К. ИБРАГИМОВ ¹

¹ НАО «Университет имени Шакарима города Семей», Республика Казахстан, 071412, Семей, ул. Глинки 20А

² Alikhan Bokeikhan University, Республика Казахстан, 071400, Семей, ул. Мәңгілік ел, 11)

Электронная почта автора корреспонденции: bibi.53@mail.ru*

В данной статье представлены результаты научных исследований по разработке биосенсорной системы для определения солей тяжелых металлов (кадмия и свинца) в молоке. При разработке биосенсорной системы уделяется большое внимание подбору биологического материала и методу их стабилизации с помощью физико-химических сил, а именно, иммобилизацией. В связи с этим проведены исследования по подбору фермента и способа его иммобилизации при разработке биосенсора для обнаружения солей тяжелых металлов в молоке. Разработка биосенсора для определения токсичных элементов в пищевых продуктах имеет научное и практическое значение. В мировой практике особое внимание уделяется загрязнению сырья и пищевых продуктов токсическими химическими веществами, в основном антропогенного происхождения, которые относятся к стойким органическим загрязнителям. Поэтому контроль качества сырья, пищевых продуктов имеет важное значение для потребителей и, соответственно, для пищевой промышленности. Экспериментальные исследования основаны на методах Филипповой А.М., Воробьевой О.В. для определения удельной активности фермента ацетилхолинэстеразы.

Определение активности фермента каталазы проводили в соответствии с газометрическим способом по методу Варбурга. В результате экспериментальных исследований в качестве чувствительного элемента был выбран фермент каталаза как биологический материал. В качестве носителя для иммобилизации ферментов была подобрана 5-ти бислоенная комбинация «хитозан-альгинат натрия». Для иммобилизации фермента на поверхности подложки при создании ферментного биосенсора применена технология layer-by-layer. Результаты исследований рекомендуется применять при изучении вопросов пищевой безопасности и при оценке показателей безопасности сырья и пищевых продуктов экспресс-методом.

Ключевые слова: биосенсорная система, биологический материал, фермент, иммобилизация, молоко.

СҮТТІҢ САПАСЫН БАҚЫЛАУ ҮШІН ҚОЛДАНЫЛАТЫН ФЕРМЕНТТІ БИОСЕНСОРЫН ЖАСАУ ҮШІН LAYER-BY-LAYER ТЕХНОЛОГИЯСЫН ҚОЛДАНУ ПЕРСПЕКТИВАЛАРЫ

¹А.К. КАКИМОВ, ²К.С. ЖАРЫКБАСОВА, ¹Г.Е. ТУЛЬКЕБАЕВА, ¹Ж.Х. КАКИМОВА,
Е.С. ЖАРЫКБАСОВ¹, Г.О. МИРАШЕВА¹, Н.К. ИБРАГИМОВ¹

¹ «Семей қаласының Шәкәрім атындағы университеті» КЕАҚ, Қазақстан Республикасы,
071412, Семей, Глинки к-сі, 20А

² Alikhan Bokeikhan University, Қазақстан Республикасы, 071400, Семей, Мәңгілік Ел к-сі, 11)
Автор-корреспонденттің электрондық поштасы: bibi.53@mail.ru

Бұл мақалада сүттегі ауыр металдардың (кадмий және қорғасын) тұздарын анықтауға арналған биосенсорлық жүйені жасау бойынша ғылыми зерттеулердің нәтижелері берілген. Биосенсорлық жүйені жасау кезінде биологиялық материалды таңдауға және оларды физикалық және химиялық күштердің көмегімен тұрақтандыру әдісіне, атап айтқанда иммобилизацияға көп көңіл бөлінеді. Осыған байланысты сүттегі ауыр металдардың тұздарын анықтауға арналған биосенсорды жасауда ферментті таңдау және оны иммобилизациялау әдісі бойынша зерттеулер жүргізілді. Тамақ өнімдеріндегі улы элементтерді анықтауға арналған биосенсорды жасаудың ғылыми және практикалық маңызы бар. Дүниежүзілік тәжірибеде шикізат пен тамақ өнімдерінің тұрақты органикалық ластағыштар болып табылатын улы химикаттармен, негізінен антропогендік шығу тегімен ластануына ерекше көңіл бөлінеді. Сондықтан шикізаттың, тамақ өнімдерінің сапасын бақылау тұтынушылар үшін, тиісінше тамақ өнеркәсібі үшін маңызды. Ацетилхолинэстераза ферментінің спецификалық белсенділігін анықтау Филиппова А.М., Воробьева О.В. эксперименттік зерттеу әдістеріне негізделген. Каталаза ферментінің белсенділігін анықтау Варбург әдісі бойынша газометриялық тәсілге сәйкес жүргізілді. Эксперименттік зерттеулер нәтижесінде сезімтал элемент ретінде биологиялық материал каталаза ферменті таңдалды. Ферменттерді иммобилизациялау үшін тасымалдаушы ретінде «хитозан-натрий альгинатының» 5 екі қабатты комбинациясы таңдалды. Layer-by-layer технологиясы фермент биосенсорын жасау кезінде субстрат бетіндегі ферментті иммобилизациялау үшін пайдаланылды. Зерттеу нәтижелерін тамақ өнімдерінің қауіпсіздігі мәселелерін зерттеуде және шикізат пен тамақ өнімдерінің қауіпсіздік көрсеткіштерін экспресс әдіспен бағалауда қолдану ұсынылады.

Негізгі сөздер: биосенсорлық жүйе, биологиялық материал, фермент, иммобилизация, сүт.

PROSPECTS FOR THE USE OF LAYER-BY-LAYER TECHNOLOGY FOR THE DEVELOPMENT OF AN ENZYME BIOSENSOR USED FOR MILK QUALITY CONTROL

¹A. KAKIMOV, ²K. ZHARYKBASSOVA, ¹G. TULKEBAYEVA, ¹ZH. KAKIMOVA,
¹YE. ZHARYKBASSOV, ¹G. MIRASHEVA, ¹N. IBRAGIMOV

¹ NPJSC «Shakarim University of Semey», Republic of Kazakhstan, 071412, Semey, st. Glinka, 20A

² Alikhan Bokeikhan University, Republic of Kazakhstan, 071400, Semey, st. Mangylik El, 11)
Corresponding author e-mail: bibi.53@mail.ru*

This article presents the results of scientific research on the development of a biosensor system for the determination of salts of heavy metals (cadmium and lead) in milk. When developing a biosensor system, much attention is paid to the selection of biological material and the method of their stabilization using physical and chemical forces, namely, immobilization. In this regard, studies were carried out on the selection of the enzyme and the method of its immobilization in the development of a biosensor for the detection of salts of heavy metals in milk. The development of a biosensor for the determination of toxic elements in food products is of scientific and practical importance. In world practice, special attention is paid to the contamination of raw materials and food products with

toxic chemicals, mainly of anthropogenic origin, which are persistent organic pollutants. Therefore, quality control of raw materials, food products is important for consumers, and, accordingly, for the food industry. Experimental studies are based on the methods of Filippova A.M., Vorobieva O.V. to determine the specific activity of the enzyme acetylcholinesterase. Determination of the activity of the catalase enzyme was carried out in accordance with the gasometric method according to the method of Warburg. As a result of experimental studies, the catalase enzyme as a biological material was chosen as a sensitive element. As a carrier for the immobilization of enzymes, a 5-bilayer combination of "chitosan-sodium alginate" was selected. The layer-by-layer technology was used to immobilize the enzyme on the substrate surface when creating an enzyme biosensor. The results of the research are recommended to be applied in the study of food safety issues and in the assessment of safety indicators of raw materials and food products by the express method.

Keywords: biosensor system, biological material, enzyme, immobilization, milk.

Введение

Биосенсоры привлекают широкое внимание как новая технология электрохимического анализа для ускоренного определения показателей безопасности пищевых продуктов, которые

позволяют определять уровень содержания токсикоэлементов даже в полевых условиях.

Биосенсоры в отличие от классических аналитических методов (высокоэффективная жидкостная хроматография, жидкостная хроматография-масс-спектрометрия и анализы на основе УФ-поглощения или флуоресценции) способны обеспечить простой, быстрый, чувствительный, селективный и, самое главное,

недорогой и надежный метод определения остаточных количеств токсикоэлементов [1-3].

Разработка биосенсора для определения токсичных элементов в пищевых продуктах является актуальным направлением. В последние десятилетия уделяется особое внимание загрязнению сырья и пищевых продуктов токсическими химическими веществами, в основном антропогенного происхождения, которые относятся к стойким органическим загрязнителям [4, 5]. Поэтому, контроль качества сырья, пищевых продуктов имеет важное значение для потребителей, и соответственно, для пищевой промышленности.

Биосенсоры – аналитический инструмент, который в комплексе состоит из биологического детектирующего элемента (биологический материал) и преобразователя. К биологическому материалу относятся ферменты, моноклональные и поликлональные антитела, нуклеиновые кислоты, клетки, ткани и другие [6, 7].

Для контроля безопасности пищевых продуктов, мониторинга объектов окружающей среды все чаще применяют биосенсоры на основе ферментов из-за их высокой селективности и чувствительности. Ферменты активизируются или ингибируются различными соединениями, в том числе такими

загрязняющими веществами, как пестициды или тяжелые металлы, что дает возможность для разработки методов определения токсикоэлементов в объектах исследования на основе изменения их активности.

Ферментативные методы анализа основаны на определении зависимости активности и катализируемой ферментом химической реакции от типа и концентрации реагирующих веществ. Поэтому селективность ферментных биосенсоров вне зависимости от того, основаны ли они на биокатализе или ингибирования, определяется специфичностью фермента [8-10].

Вместе с тем, при разработке методов анализа, включающих в качестве чувствительного элемента биологические объекты, в частности, ферменты, встает вопрос стабилизации и сохранения свойств используемого биообъекта. Известно, что молекулы ферментов являются весьма нестабильными и чувствительными к воздействию внешних факторов, и нарушение их нативной структуры приводит к снижению их активности. В данной области в последние годы ученые все больше применяют метод стабилизации с помощью физико-химических сил – иммобилизации фермента [11].

Для получения иммобилизованных ферментов большое значение имеет подбор носителя. В настоящее время универсальных носителей для иммобилизации ферментов не существует. Материал, который применяется в качестве носителя, должен обладать такими свойствами, как биосовместимость, химическая и термическая стабильность, нерастворимость в условиях реакции, устойчивость к физическим нагрузкам, возможность легкого восстановления и повторного использования, экономичность, экологичность [12-15].

В последние годы уделяется большое внимание использованию биополимеров в качестве носителя для иммобилизации фермен-

тов из-за их доступности и природного изобилия. Биополимеры обладают такими свойствами, как нетоксичность, биосовместимость, способность к биологическому разложению, гибкость, возобновляемость [16].

На основании вышеизложенного в данной работе поставлена цель – провести исследования по подбору фермента и способа его иммобилизации при разработке биосенсора для обнаружения солей тяжелых металлов в молоке.

Материалы и методы исследований

Удельная активность фермента ацетилхолинэстеразы определена на основании методики Филипповой А.М., Воробьевой О.В. спектрофотометрическим методом [17].

2 мл буферного раствора (рН 8,4) добавляют к 0,1 мл водного раствора фермента ацетилхолинэстеразы, термостатируют при

температуре 37 °С продолжительностью 30 минут. Параллельно в пробирке смешивают 0,5 мл ацетилхолина и 2,0 мл молока, добавляют 0,3 мл раствора индикатора фенолового красного и термостатируют при температуре 37 °С продолжительностью 30 минут.

По окончании ферментативной реакции определяют оптическую плотность образца на приборе КФК-5 при длине волны 540 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм по малиновой окраске. В качестве стандартного раствора применяют раствор исследуемого молока в воде в соотношении 1:1.

Количество выделившейся уксусной кислоты определяют по калибровочному графику.

Расчет удельной активности холинэстеразы производят по формуле (1):

$$A = \frac{V_{(HAc)}}{V_{(ChE)}} \quad (1)$$

где: $V_{(HAc)}$ – моль уксусной кислоты, моль;

$V_{(ChE)}$ – объем раствора фермента, мл.

Определение активности фермента каталазы проводили в соответствии с газометрическим способом по методу Варбурга, принцип которого заключается в улавливании и измере-

нии объема выделившегося кислорода после прибавления к водному раствору перекиси водорода и фермента каталазы.

Для этого собирали установку, согласно рисунку 1, состоящую из бюретки, колбы, газоотводной трубки и сосуда с водой. Колбу устанавливают на магнитную мешалку с подогревом.

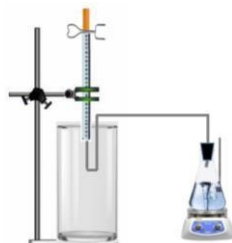


Рисунок 1 – Схема прибора для определения активности фермента

В ходе работы отмеряли 15 мл молока с температурой 25 °С, 5 мл стерильного 3%-ного раствора перекиси водорода, 0,001 г кристаллизованной каталазы. В колбу с молоком добавляли раствор перекиси водорода, каталазу и быстро закрывали резиновой пробкой с газоотводной трубкой, соединенной с бюреткой вместимостью 50 мл. Предварительно уровень воды в бюретке доводят до нулевой

отметки. При постоянном перемешивании и температуре содержимого колбы ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), контроле давления производили отсчет уровня кислорода, накопившегося в бюретке в течении 1 мин. Результат, выражают количеством выделившегося кислорода (в мл), значение которого приводили к нормальным условиям по объединенному газовому закону Клапейрона (2).

$$\frac{P_1 V_1}{T_1} = \frac{P_2 V_2}{T_2}, \text{ или } \frac{PV}{T} = const \quad (2)$$

где: P_1 – начальное давление, кПа;
 P_2 – конечное давление, кПа;

V_1 – начальный объем, мл;
 V_2 – конечный объем, мл;

T_1 – температура первого газа, К;

T_2 – конечная температура, К.

Метод иммобилизации layer by layer – это послойный метод, заключающийся в образовании тонкой пленки, покрывающей биоматериал. Пленка формируется за счет нанесения чередующихся слоев противоположно заряженных полимеров. Для этого подложку с нанесенным на ее поверхность ферментом последовательно погружали в растворы хитозана (0,161 г хитозана на 100 мл 3% уксусной кислоты) и альгината натрия (0,198 г альгината натрия на 100 мл воды). Датчик с адгезированным биоматериалом окунали в раствор положительно заряженного и в раствор отрицательно заряженного полиэлектролита на глубину 5 мм с выдержкой 2 секунды поочередно в каждый раствор. Количество погружений варьировали до образования от 1 до 9 слоев. Высушивали при температуре 35 °С в течении 2 ч.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе для выбора фермента как биологического материала проведены исследования по определению изменения его активности под влиянием солей тяжелых металлов.

По данным литературных источников наиболее чувствительными к ингибирующему действию тяжелых металлов являются ферменты класса оксидоредуктаз (каталаза), а также

гидролитические ферменты (ацетилхолинэстераза) [17-19]. В связи с этим в разработке биосенсорной тест-системы для определения солей тяжелых металлов были использованы ферменты каталаза и ацетилхолинэстераза.

Ингибирующее действие солей тяжелых металлов (кадмия и свинца) на фермент ацетилхолинэстеразу определяли по изменению удельной активности фермента. Удельная активность фермента определяется по количеству выделившейся уксусной кислоты в результате ферментативной реакции тяжелых металлов с ацетилхолинэстеразой.

Изучение влияния ионов тяжелых металлов проводилось по методу Филипповой А.М., Воробьевой О.В., с добавлением 0,02 мг/кг солей тяжелых металлов (свинца и кадмия).

В качестве среды для исследования использовали молоко коровье.

Активность фермента измеряли в трех вариациях среды:

- в среде, не содержащей соли тяжелых металлов (контроль);
- в среде, содержащей соли кадмия;
- в среде, содержащей соли свинца.

На рисунке 2 представлен калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от объема выделившейся уксусной кислоты в растворе для среды, не содержащей соли тяжелых металлов.

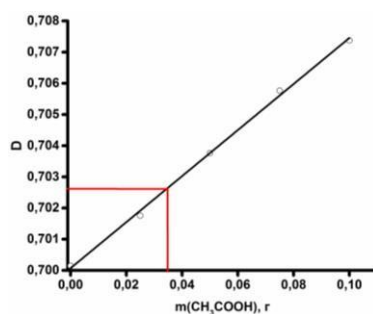


Рисунок 2 – Калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от объема выделившейся уксусной кислоты в растворе

Из рисунка 2 видно, что при оптической плотности раствора субстрата с ферментом равной 0,7027 масса уксусной кислоты в растворе составила 0,033 г.

Для определения количества молей уксусной кислоты массу образовавшейся кислоты необходимо разделить на молярную массу уксусной кислоты:

$$0,033/60=5,5 \cdot 10^{-4} \text{ моль} = 0,55 \text{ ммоль}$$

По формуле 1 рассчитаем удельную активность фермента:

$$A = \frac{0,55 \text{ ммоль}}{0,1 \text{ мл}} = 5,5 \text{ ммоль/мл}$$

На рисунке 3 представлен калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от объема выделившейся уксусной

кислоты в растворе для среды, содержащей соли кадмия.

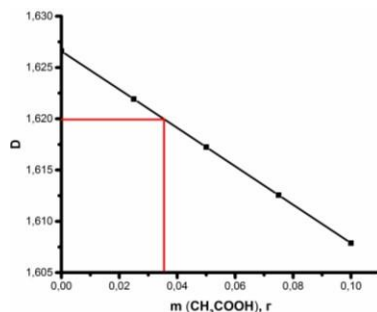


Рисунок 3 – Калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от объема выделившейся уксусной кислоты в растворе

Из рисунка 3 видно, что при оптической плотности раствора субстрата с ферментом 1,62 единиц масса уксусной кислоты в растворе составило 0,035 мг.

Для расчета количества молей уксусной кислоты необходимо массу образовавшейся кислоты разделить на молярную массу уксусной кислоты:

$$0,035/60=0,59*10^{-3} \text{ моль} = 0,59 \text{ ммоль}$$

Удельная активность фермента составила:

$$A = \frac{0,59 \text{ ммоль}}{0,1 \text{ мл}} = 5,9 \text{ ммоль/мл}$$

На рисунке 4 представлен калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от объема выделившейся уксусной

кислоты в растворе для среды, содержащей соли свинца.

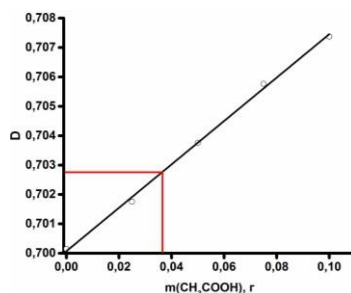


Рисунок 4 – Калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от объема выделившейся уксусной кислоты в растворе

Из рисунка 4 видно, что при оптической плотности раствора субстрата с ферментом 0,703 единиц масса уксусной кислоты в растворе составила 0,036 мг.

уксусной кислоты перевести в моль, для этого делим массу уксусной кислоты на молярную массу кислоты:

Для дальнейшего расчета удельной активности фермента необходимо массу

$$0,036/60=6*10^{-4} \text{ моль} = 0,6 \text{ ммоль}$$

Далее рассчитываем удельную активность по формуле

$$A = \frac{0,60}{0,1 \text{ мл}} = 6,0 \text{ ммоль/мл}$$

На основании проведенных экспериментальных исследований по определению удельной активности ацетилхолинэстеразы установлено, что ингибирующее действие солей тяжелых металлов (кадмия и свинца) незначительно влияет на удельную активность фермента ацетилхолинэстеразы при сравнении с контрольным образцом.

На следующем этапе экспериментальных исследований для выбора фермента определено ингибирующее действие солей свинца и кадмия на активность каталазы.

В качестве среды для исследования использовали молоко коровье. Активность фермента измеряли в трех вариациях среды:

- в среде, не содержащей соли тяжелых металлов (контроль);
- в среде, содержащей соли кадмия;
- в среде, содержащей соли свинца.

Ферментативную активность каталазы определяли газометрическим способом по методу Варбурга, с добавлением 0,02 мг/кг солей тяжелых металлов (свинца и кадмия). Активность каталазы была определена по объему кислорода, выделившегося в результате разложения перекиси водорода.

На основе математического анализа рассчитана степень превращения субстрата. Результаты представлены на рисунке 5.

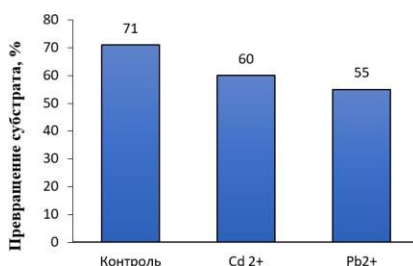


Рисунок 5 – Степень превращения субстрата (%) в присутствии солей тяжелых металлов в молоке

Как видно из рисунка 5, в присутствии солей тяжелых металлов активность фермента снижается. В присутствии солей кадмия наблюдается превращение субстрата до 60 %, в присутствии ионов свинца – до 55 %.

В результате экспериментальных исследований по определению ингибирующего действия солей тяжелых металлов (кадмия и свинца) на ферменты ацетилхолинэстеразы и каталаза установлено, что наиболее чувствительным к ингибирующим действиям солей тяжелых металлов является фермент каталаза.

На следующем этапе экспериментальных исследований определена оптимальная концентрация фермента каталазы для создания биосенсорной системы в зависимости от скорости разложения перекиси водорода на воду и кислород за единицу времени. Результаты исследований показали, что при низком

содержании фермента в биосенсорной системе наблюдается слабая реакция. Высокая же концентрация фермента приводит к бурной реакции, зачастую угасающей раньше установленного времени. В исследовании изучали концентрацию фермента от 0,0005 до 0,005 г. Известно, что константа Михаэлиса-Ментена для реакции разложения перекиси водорода под действием каталазы составляет 25 мМ. Применяя K_M для наших условий установлено, что за 1 минуту 1 единица каталазы разлагает 0,025 моль перекиси водорода. Рассчитанное значение максимально возможного объема выделившегося кислорода при заданных условиях составило 2200 мкмоль.

На рисунке 6 представлена зависимость объема выделившегося кислорода от концентрации фермента.

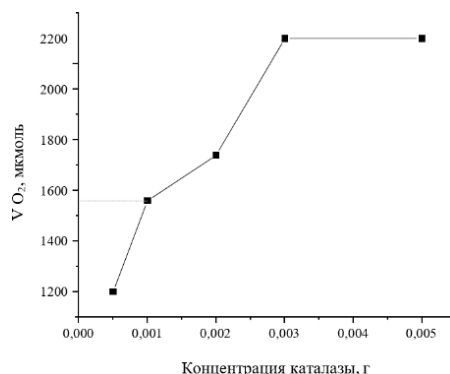


Рисунок 6 – Зависимость объема выделившегося кислорода от концентрации фермента

Из результатов, представленных на рисунке 6 видно, что при концентрации фермента ниже 0,001 г реакция протекает медленно, разложение перекиси водорода превышает установленное время. При концентрации выше 0,001 г кислород выделяется активно, реакция прекращается преждевременно. При концентрации каталазы 0,001 г за 1 минуту происходит полный цикл разложения перекиси водорода и выделяется кислород в объеме 1560 мкмоль. На основании проведенных исследований установлено, что оптимальная концентрация фермента каталазы для создания биосенсорной системы составляет 0,001 г.

На следующем этапе проведены исследования по подбору метода и носителя для иммобилизации фермента (каталаза). При создании ферментных биосенсоров, особое внимание уделяется процессу иммобилизации

биологического материала на поверхности подложки, так как от способа закрепления будет зависеть чувствительность биосенсора и качество его измерений. В данной работе использована технология layer-by-layer при которой противоположно заряженные полиэлектролиты образуют мультислои на поверхности подложки. В качестве носителя для иммобилизации использовали природные полимеры, свойства которых максимально приближены к естественным условиям и являются щадящими для фермента. Для иммобилизации фермента использовали два варианта мультислоев: в первом – комбинация «хитозан-альгинат натрия», во втором – «хитозан-натрийкарбоксиметилцеллюлоза (КМЦ)».

По уравнению Нернста (3) рассчитали значение электродного потенциала для окислительно-восстановительной реакции разложения перекиси водорода.

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{a(Red)}{a(Ox)} \quad (3)$$

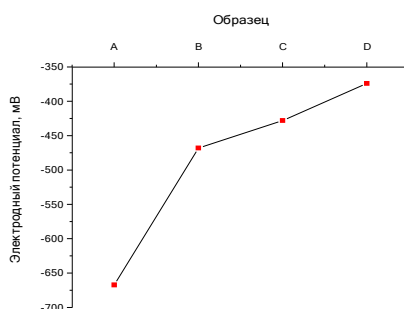
где: R – универсальная газовая постоянная, равная 8,31 Дж/(моль*К);
 T – абсолютная температура;

F – число Фарадея, равное 36500 Кл/моль;
 n – число молей электронов, участвующих в процессе.

$$E = -0,68 - \frac{8,31 * 310}{2 * 96500} \ln \frac{0,0016}{0,0042}$$

Рассчитанное значение электродного потенциала в данных условиях составило 667,2 мВ. Электродный потенциал опытных образцов измеряли на цифровом двухканальном запоминающем осциллографе марки АСК-2034 (Россия, 2008 г.) в режиме постоянного тока. Результаты многократных измерений на подложке с мультислоем комбинации

«хитозан-КМЦ» имели большой разброс данных, что позволило сделать вывод о нецелесообразности применения данной комбинации для иммобилизации фермента. Результаты измерений на подложке с мультислоем комбинации «хитозан-альгинат натрия» показаны на рисунке 7.



A – контроль («идеальные условия»); B – тестируемая подложка;
C – тестируемая подложка с CdSO₄; D – тестируемая подложка с Pb(NO₃)₂.

Рисунок 7 – Показатель электродного потенциала в образцах

Как видно из рисунка 7, фактически полученный показатель электродного потенциала реакции, проводимой на полимерной подложке с иммобилизованным ферментом немного ниже, чем выведенный теоретически возможный. Разница незначительная и находится в пределах допустимого значения, т.к. в ходе эксперимента удалось вывести систематическую зависимость активности фермента от воздействия компонентов среды.

Для активного отклика фермента на воздействие ингибиторов следует наносить его

в концентрации, равной 0,1 г/мл фосфатного буферного раствора. Дозиметром наносим 0,01 мл раствора фермента на открытую ячейку биосенсора и подсушиваем. Фермент адгезируется на ячейке подложки датчика.

Затем проводили иммобилизацию фермента. Датчик с подсушенным ферментом поочередно погружали в положительно заряженный и отрицательно заряженный полиэлектролиты. Готовили вариации с нанесением 1-го, 3-х, 5-ти, 7-ми и 9-ти бислоев до образования плотной мультислоевой мембраны.

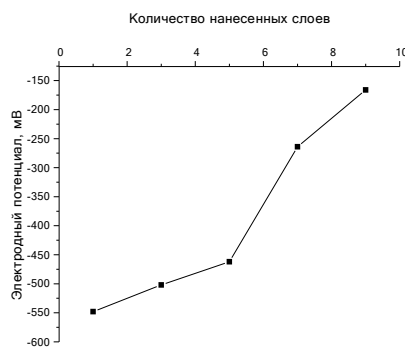


Рисунок 8 – Зависимость величины электродного потенциала от количества нанесенных слоев при иммобилизации комбинацией «хитозан-альгинат натрия»

Как показано на рисунке 8, при увеличении количества бислоев до 7 и 9 - наблюдались низкие показатели электродного потенциала -152 мВ и -264 мВ соответственно, вероятно, по причине того, что с увеличением толщины мембраны ограничивалась диффузия молекул субстрата и продукта к поверхности носителя. В образцах с ферментом, иммобилизованным 5-ю и менее бислоями отмечен достаточно высокий электродный потенциал - 432 мВ и выше. Но, при этом - в образцах с

количеством бислоев меньше 5 – наблюдалось выделение незначительного количества белка. Экспериментально установлено, что образцы с 5-ю бислоями показывают надежность иммобилизации фермента и высокий электродный потенциал.

Заключение, выводы

В результате экспериментальных исследований в качестве тест объекта для обнаружения солей тяжелых металлов в молоке выбран фермент – каталаза с оптимальной

концентрацией 0,001 г для создания биосенсорной системы.

Для иммобилизации фермента на поверхности подложки при создании ферментного биосенсора применена технология layer-by-layer, при которой противоположно заряженные полиэлектролиты образуют мультислой на поверхности подложки с 5-ю бислойной комбинацией «хитозан-альгинат натрия».

Ферментные биосенсоры, созданные на основе технологии layer-by-layer, рекомендуются применять для контроля качества молока экспресс-методом и обеспечения безопасности молочных продуктов.

Финансирование

Статья опубликована в рамках грантового финансирования АР09260805 «Разработка биосенсора для определения высоко кумулятивных ксенобиотиков в молоке и молочных продуктах на основе регионального мониторинга безопасности пищевых продуктов».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kadam U.S., Hong J.C. Advances in aptameric biosensors designed to detect toxic contaminants from food, water, human fluids, and the environment // *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. – 2022. – Vol.36. – <https://doi.org/10.1016/j.teac.2022.e00184>
2. Curulli A. Electrochemical Biosensors in Food Safety: Challenges and Perspectives // *Molecules*. – 2021. – 26(10). – <https://doi.org/10.3390/molecules26102940>
3. Eyvazi S., Baradaran B., Mokhtarzadeh A. et.al. Recent advances on development of portable biosensors for monitoring of biological contaminants in foods // *Trends in Food Science & Technology*. – 2021. – Vol.114. – P.712-721
4. Guo W., Pan B., Sakkiah S. et.al. Persistent Organic Pollutants in Food: Contamination Sources, Health Effects and Detection Methods // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2019. – 16(22). – 4361. – <https://doi.org/10.3390/ijerph16224361>
5. Garvey M. Food pollution: a comprehensive review of chemical and biological sources of food contamination and impact on human health // *Nutrire*. – 2019. – 44 (2). - DOI:10.1186/s41110-019-0096-3
6. Naresh V., Lee N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors // *Sensors*. – 2021. – 21 (4). – 1109. - <https://doi.org/10.3390/s21041109>
7. Бутусов Л.А., Чудинова Г.К., Борулева Е.А. и др. Возможности и перспективы биосенсорных технологий в анализе продуктов питания // *Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство*. – 2018. – Т.13, №1. – С.70-77
8. Lynette Alvarado-Ramirez, Magdalena Rostro-Alanis, Jose Rodriguez- Rodriguez et.al. Enzyme (Single and Multiple) and Nanozyme Biosensors: Recent Developments and Their Novel Applications in the Water-Food-Health Nexus // *Biosensors*. – 2021. – 11 (11). – 410. - <https://doi.org/10.3390/bios11110410>
9. Bogdan Bucur, Cristina Purcarea, Silvana Andreescu et.al. Addressing the Selectivity of Enzyme Biosensors: Solutions and Perspectives // *Sensors*. – 2021. – 21 (9). – 3038. - <https://doi.org/10.3390/s21093038>
10. Будников Г.К., Евтюгин Г.А. Экспресс-тестовые методы определения ингибиторов гидролитических ферментов с помощью электрохимических биосенсоров / Г.К. Будников, Г.А. Евтюгин // *Рос.хим. ж. им. Д.И. Менделеева*. – 2001. - Т.14, № 4. – С. 86-94
11. Ramesh R., Puhazhendi P., Kumar J. et.al. Potentiometric biosensor for determination of urea in milk using immobilized *Arthrobacter creatinolyticus* urease // *Materials Science and Engineering: C*. – 2015. – V.49. – P.786-792
12. Meena J., Gupta A., Ahuja R. et.al. Recent advances in nano-engineered approaches used for enzyme immobilization with enhanced activity // *Journal of Molecular Liquids*. – 2021. – Vol.338, 15. - <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116602>
13. Liu D., Dong C. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications // *Process Biochemistry*. – 2020. – Vol. 92. – P.464-475
14. Chandra P., Singh E.R., Arora P.K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review // *Microbial Cell Factories*. – 2020. – Vol.19. - DOI:10.1186/s12934-020-01428-8
15. Утегенова А.О., Ашкенова З.Н., Какимова Ж.Х. и др. Особенности функционирования и практического применения биосенсоров на основе фермента холинэстеразы // *Материалы Международной научно-практической конференции, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова*. – Семей, 2018. – С. 271-273.
16. Bilal M., Hafiz M.N. Iqbal Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – Vol. 130. – P. 462-482
17. Филиппова А.М. Разработка технологии формирования биосенсорных тест-систем на основе композиционных материалов: автореферат канд. биол. наук: 03.01.06/ Филиппова Анастасия Михайловна – Ставрополь, 2013. – 20 с.
18. Утегенова А.О. Разработка биометрических методов определения ксенобиотиков в молоке: дисс. на соиск. ст. PhD: 16.03.2023 / А.О. Утегенова. – Семей, 2023. – 158 с.
19. Farag M.A., Taniou M., AlKarimy S. et.al. Biosensing approaches to detect potential milk contaminants: a comprehensive review // *Food Additives & Contaminants: Part A*. – 2021. – Vol.38. – P.1169-1192.

REFERENCES

1. Kadam U.S., Hong J.C. Advances in aptameric biosensors designed to detect toxic contaminants from food, water, human fluids, and the environment // *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. – 2022. – Vol.36. – <https://doi.org/10.1016/j.teac.2022.e00184>
2. Curulli A. Electrochemical Biosensors in Food Safety: Challenges and Perspectives // *Molecules*. – 2021. – 26(10). – <https://doi.org/10.3390/molecules26102940>
3. Eyvazi S., Baradaran B., Mokhtarzadeh A. et.al. Recent advances on development of portable biosensors for monitoring of biological contaminants in foods // *Trends in Food Science & Technology*. – 2021. – Vol.114. – P.712-721
4. Guo W., Pan B., Sakkiah S. et.al. Persistent Organic Pollutants in Food: Contamination Sources, Health Effects and Detection Methods // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2019. – 16(22). – 4361. – <https://doi.org/10.3390/ijerph16224361>
5. Garvey M. Food pollution: a comprehensive review of chemical and biological sources of food contamination and impact on human health // *Nutrire*. – 2019. – 44 (2). - DOI:10.1186/s41110-019-0096-3
6. Naresh V., Lee N. A Review on Biosensors and Recent Development of Nanostructured Materials-Enabled Biosensors // *Sensors*. – 2021. – 21 (4). – 1109. - <https://doi.org/10.3390/s21041109>
7. Butusov L.A., Chudinova G.K., Boruleva E.A. i dr. “Vozmozhnosti i perspektivy biosensornykh tekhnologij v analize produktov pitaniya [Opportunities and perspectives of biosensor technologies in food analysis]” // *Vestnik Rossijskogo universiteta družby narodov. Seriya: Agronomiya i zhivotnovodstvo*. – 2018. – T.13, №1. – S.70-77
8. Lynette Alvarado-Ramirez, Magdalena Rostro-Alanis, Jose Rodriguez- Rodriguez et.al. Enzyme (Single and Multiple) and Nanozyme Biosensors: Recent Developments and Their Novel Applications in the Water-Food-Health Nexus // *Biosensors*. – 2021. – 11 (11). – 410. – <https://doi.org/10.3390/bios11110410>
9. Bogdan Bucur, Cristina Purcarea, Silvana Andreescu et.al. Addressing the Selectivity of Enzyme Biosensors: Solutions and Perspectives // *Sensors*. – 2021. – 21 (9). – 3038. - <https://doi.org/10.3390/s21093038>
10. Budnikov G.K., Evtugin G.A. “Ekspress-testovye metody opredeleniya ingibitorov gidroliticheskikh fermentov s pomoshch'yu elektrohimicheskikh biosensorov [Rapid test methods for the determination of hydrolytic enzyme inhibitors using electrochemical biosensors]” / G.K. Budnikov, G.A. Evtugin // *Ros.him. zh. im. D.I. Menedeleeva*. – 2001. - T.14, № 4. – S. 86-94
11. Ramesh R., Puhazhendi P., Kumar J. et.al. Potentiometric biosensor for determination of urea in milk using immobilized *Arthrobacter creatinolyticus* urease // *Materials Science and Engineering: C*. – 2015. – V.49. – P.786-792
12. Meena J., Gupta A., Ahuja R. et.al. Recent advances in nano-engineered approaches used for enzyme immobilization with enhanced activity // *Journal of Molecular Liquids*. – 2021. – Vol.338, 15. - <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116602>
13. Liu D., Dong C. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications // *Process Biochemistry*. – 2020. – Vol. 92. – P.464-475
14. Chandra P., Singh E.R., Arora P.K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review // *Microbial Cell Factories*. – 2020. – Vol.19. - DOI:10.1186/s12934-020-01428-8
15. Utegenova A.O., Ashkenova Z.N., Kakimova ZH.H. i dr. “Osobennosti funkcionirovaniya i prakticheskogo primeneniya biosensorov na osnove fermenta holinesterazy [Features of functioning and practical application of biosensors based on cholinesterase enzyme]” // *Materialy Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii, posvyashchennaya pamyati Vasiliya Matveevicha Gorbatova*. – Semej, 2018. – S. 271-273.
16. Bilal M., Hafiz M.N. Iqbal Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – Vol. 130. – P. 462-482
17. Filippova A.M. “Razrabotka tekhnologii formirovaniya biosensornykh test-sistem na osnove kompozitsionnykh materialov [Development of technology for formation of biosensor test systems based on composite materials]”, avtoreferat kand. biol. nauk: 03.01.06/ Filippova Anastasiya Mihajlovna – Stavropol', 2013. – 20 s.
18. Utegenova A.O. “Razrabotka biometricheskikh metodov opredeleniya ksenobiotikov v moloke [Development of biometric methods for the determination of xenobiotics in milk]”. Dissertatsiya na soiskanie stepeni PhD: 16.03.2023 / A.O. Utegenova. – Semej, 2023. – 158 s.
19. Farag M.A., Tanios M., AlKarimy S. et.al. Biosensing approaches to detect potential milk contaminants: a comprehensive review // *Food Additives & Contaminants: Part A*. – 2021. – Vol.38. – P.1169-1192.