

УДК 57.043:577.15:543.15

О.А. Нардід\*, Д.О. Мангасаров, М.І. Щетинський

## Технологічні підходи до кріоконсервування біосенсорів на основі ферментів

UDC 57.043:611.013:57.043

### O.A. Nardid\*, D.O. Mangasarov, M.I. Schetinskiy Technological Aspects for Cryopreservation of Enzyme-Based Biosensors

**Реферат:** На основі запропонованих способів зберігання ферментних біосенсорів відпрацьовано технологічний процес, який дозволяє швидко й зручно проводити процедури заморожування, зберігання й відігрівання цих пристроїв. Для цього було розроблено й виготовлено зразки низькотемпературних контейнерів, холдер-касет, обладнання для заморожування згідно з необхідними режимами. З урахуванням виготовленого устаткування створено технологію довгострокового зберігання мініатюрних електрохімічних біосенсорів на основі глюкозооксидази.

**Ключові слова:** довгострокове зберігання, ферментний біосенсор, пристрій для заморожування, холдер-касети, низькотемпературні контейнери.

**Реферат:** На основе предложенных способов хранения ферментных биосенсоров отработан технологический процесс, который позволяет быстро и удобно проводить процедуры замораживания, хранения и отогрева этих устройств. Для этого были разработаны и изготовлены образцы контейнеров, холдер-кассет, оборудования для замораживания согласно необходимых режимов. С учетом изготовленного оборудования создана технология долгосрочного хранения миниатюрных электрохимических биосенсоров на основе глюкозооксидазы.

**Ключевые слова:** долгосрочное хранение, ферментный биосенсор, устройство для замораживания, холдер-кассеты, низкотемпературные контейнеры.

**Abstract:** Basing on the proposed approaches for storage of enzyme-based biosensors a technological process was developed, which allowed rapid and easy freezing, storage and warming of these devices. To do this we designed and produced the samples of containers, holder-cassettes, equipment for freezing according to the needed regimens. The produced equipment was involved to creation of technology for long-term storage of miniature glucose oxidase-based electrochemical biosensors.

**Key words:** long-term storage, enzyme biosensor, device for freezing, cassette holder, low temperature containers.

Біосенсор – аналітичний пристрій, який складається з біологічного перетворювача (чутливий шар біоматеріалу, біоселективна мембрана) та фізико-хімічного перетворювача (трансдюсера) [1, 3]. Останній перетворює біохімічний сигнал на електронний та забезпечує якісний чи кількісний аналіз певної речовини або класу речовин. Біохімічний сигнал – результат реакції біоселективного елемента з аналізованою речовиною, наприклад це поглинання або генерування певного типу молекул (кисню, перекису водню), іонів (протонів, іонів амонію), виділення тепла тощо. Ферменти, антитіла, рецептори, клітинні органели та мікроорганізми є тим біологічним матеріалом, який використовується у біосенсорах залежно від мети та умов їхнього застосування [1].

Найважливіші характеристики біосенсорних пристроїв – висока чутливість і селективність, прос-

Biosensor is analytical device consisting of biological (sensitive layer of biomaterial, bioselective membrane) and physico-chemical transducers [1, 3]. The latter transforms biochemical signal into electric one and provides qualitative and quantitative analysis of certain substance or class of those. Biochemical signal is the result of reaction of bioselective element with the substance to be analyzed, *i. e.* absorption or generating of certain type of molecules (oxygen, hydrogen peroxide), ions (protons, ammonium ions), heat release and *etc.* Enzymes, antibodies, receptors, cell organelles and microorganisms are the biological materials used in biosensors, depending on the purpose and conditions of their application [1].

The most important characteristics of biosensor devices are sensitivity and selectivity, usability and speed of an environment analysis, as well as a breadth of substances range which can be detected by means of

Відділ кріобіофізики, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:  
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015;  
тел.: (+38 057) 373-31-41, факс: (+38 057) 373-30-84,  
електронна пошта: olnard@mail.ru

Надійшла 03.06.2013  
Прийнята до друку 26.06.2013

Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2013. – Т. 23, №4. – С. 338–346.  
© 2013 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Department of Cryobiophysics, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\* To whom correspondence should be addressed:  
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;  
tel.: +380 57 373 3141, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: olnard@mail.ru

Received June, 03, 2013  
Accepted June, 26, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 4. – P. 338–346.  
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

тота у використанні та швидкість аналізу середовища, а також широкий діапазон речовин, що можуть бути детектовані. Це визначає можливість їхнього застосування в медицині, фармацевтичному, харчовому, біотехнічному та хімічному виробництвах, сільському господарстві, охороні навколишнього середовища тощо.

Ферментні біосенсори у порівнянні з іншими видами сенсорів, наприклад виготовленими на основі біологічних тканин [15] і клітин [14], мають більшу селективність і чутливість, які найчастіше є визначальними показниками. У той же час використання ферментів обмежене їхньою порівняно низькою стійкістю за кімнатної температури. В залежності від природи біологічного перетворювача він зберігає активність в іммобілізованому стані за помірно низьких температур (4°C, побутовий холодильник) протягом 12 діб (дріжджові клітини) [12], 37 діб (поліфенолоксидаза) [11] або близько 3-х місяців (алкоголь-дегідрогеназа) [16]. Після швидкого заморожування такі ферменти, як ліпаза, амілаза, трипсин і хімотрипсин, можуть зберігатися деякий час в ізольованому стані при -20...-25°C під захистом гліцерину [4, 8, 17]. Однак інактивація більшості ферментів відбувається саме в цьому діапазоні температур у результаті дії концентрованих розчинів солей після виморожування більшої частини води [5, 6]. При заморожуванні водних розчинів складних білків з четвертинною структурою характер кріопшкоджень змінюється. Так, після заморожування-відігріву розчину лактатдегідрогенази спостерігалась гібридизація ізоферментних форм. Виявлено три додаткові ізоферментні фракції, які мали проміжну електрофоретичну рухливість відносно початкових форм [13]. Такі внутрішньомолекулярні перебудови ферменту спостерігали після застосування повільних або багаторазових режимів заморожування до -30 або -70°C, коли «ефекти розчину» виявляють максимальну пошкоджуючу дію на біомакромолекули. Разом з тим, якщо лактат-дегідрогеназу заморожувати швидко до -196°C у безсольовому водному середовищі, гібридизація не спостерігається [13]. Тому для зберігання біосенсорів на основі ферментів протягом тривалого часу з використанням кріобіологічних технологій необхідно, перш за все, визначити оптимальні режими охолодження та відігріву, які забезпечать збереження структурно-функціональних властивостей біологічної частини пристрою.

Представлена робота являє собою опис розробленого технологічного процесу для довгострокового зберігання електрохімічних ферментних біосенсорів за низької температури, а також їх охолодження та відігріву.

the devices. This determines the possibility of their use in medicine, pharmaceutical, food, biotechnological and chemical industries, agriculture, environmental protection and *etc.*

If compared with other types of sensors, *e. g.* made of biological tissues [15] and cells [14], the enzyme-based biosensors have higher selectivity and sensitivity, which often are critical parameters. However, the usability of enzymes is limited by their relatively low stability at room temperature. Depending on the nature of the biological component of biosensors this could remain active in immobilized state at moderately low temperature (4°C, *e.g.* domestic refrigerator) only for 12 days (yeast cells) [12], 37 days (polyphenol oxidase) [11], or about 3 months (alcohol dehydrogenase) [16]. After rapid freezing, such enzymes as lipase, amylase, trypsin and chymotrypsin may be preserved for some time in an isolated state within temperature range of -20...-25°C under glycerol protection [4, 8, 17]. However, inactivation of major part of enzymes occurs exactly within this temperature range due to the effect of concentrated salt solutions after freezing-out of the bulk water [5, 6]. In case of freezing aqueous solutions of complex proteins with quaternary structure the character of cryoinjuries changes. For example, freeze-thawing of lactate dehydrogenase solution resulted in hybridization of isoenzyme forms. Three additional isoenzyme fractions were revealed, which had intermediate electrophoretic mobility as for initial forms [13]. These intramolecular rearrangements of the enzyme were observed after slow or multiple freezing down to -30 or -70°C, when the 'solution effects' had the maximum damaging effect on biomacromolecules. However, if lactate dehydrogenase was frozen rapidly down to -196°C in salt-free aqueous medium, no hybridization was observed [13]. Therefore, the proper long-term storage of the enzyme-based biosensors using cryobiological techniques needs first of all the providing of optimal cooling and warming regimens, which would contribute to the preservation of structural and functional properties of biological component of a device.

This work is the description of technological process, which provides a long-term storage of electrochemical enzyme biosensors at low temperature, as well as cooling and warming.

Technological process was developed within the frames of research project 'Investigation of the Methods to Preserve Stable Activity of Biological Sensors During Long-Term Storage' which was a part of the program 'Investigations in Sensor Systems and Technologies', using electrochemical enzyme biosensors provided by the Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine



Технологічний процес розроблено в рамках наукового проекту «Дослідження способів збереження стабільної активності біологічних датчиків при довгостроковому зберіганні», який є частиною програми «Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій» на електрохімічних ферментних біосенсорах наданих Інститутом молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ). Біосенсори були виготовлені на основі тонкоплівкових кондуктометричних перетворювачів (Інститут хемо- і біосенсорики, Німеччина), і глюкозооксидази з *Aspergillus niger* («Faizyme», ПАР), додатково очищеної методом гель-хроматографії на колонці з сефадексом G-200.

Для заморожування біосенсорів за необхідними режимами сконструйовано спеціальне устаткування [9].

Раніше було показано, що для кріоконсервування електрохімічних ферментних біосенсорів необхідно використовувати кріозахисні сполуки [2]. У зв'язку з цим перед процедурою кріоконсервування протестований біосенсор поміщали у плівковий контейнер з наступним додаванням водного розчину кріопротектора гліцерину або 1,2-пропандіолу. Основними фізико-хімічними параметрами гліцерину, який використовувався, є температура кипіння при 760 мм рт. ст. – 290°C; питома вага при 20°C – 1,2613 г/см<sup>3</sup>; показник заломлення світла при 20°C – 1,4740. Використаний у роботі пропандіол додатково очищено перегонкою. Основні його фізико-хімічні параметри: температура кипіння при 760 мм рт. ст. – 188°C; питома вага при 20°C – 1,035–1,040 г/см<sup>3</sup>; показник заломлення світла при 20°C – 1,431–1,433. Контейнер виготовлено з композитної поліімід-фторопластової плівки [10] методом зварювання у вигляді плоского прямокутника розміром 15×40 мм відповідно до розмірів біосенсора. Технологічно контейнер спочатку зварюють з трьох боків, одну з менших сторін залишають вільною для заповнення розчином кріопротектора. Після розміщення у ньому біосенсора та додавання 60%-го водного розчину гліцерину або 1,2-пропандіолу (близько 0,5 мл) товщина контейнера складає ~2 мм (рис. 1). Далі його остаточно герметично заварюють зі сторони, яка залишалась вільною, спеціально розробленим пристроєм, розміщують у касеті-холдері та охолоджують із швидкістю 1–3 град/хв до –196°C (або до –80°C). Таку швидкість охолодження використовують для кращого збереження структурно-функціонального стану глюкозооксидази і цілісності електрохімічного трансдьюсера [2]. Після цього контейнер переносять у сховище і зберігають при –196 або –80°C.

Для зберігання біосенсорів після повільного охолодження за температури –80°C було розробле-

(Kyiv). The biosensors were produced on the base of thin-film conductometric transducers (Institute of Chemo- and Biosensorics (Germany) and glucose oxidase from *Aspergillus niger* (Faizyme, South Africa), additionally purified by gel chromatography in Sephadex G-200 column.

Biosensors were frozen in the equipment specially designed to comply the needed regimens [9].

It was previously shown that to cryopreserve electrochemical enzyme biosensors one should apply cryoprotective compounds [2]. In this regard prior to cryopreservation the biosensor was placed into a film container, and then an aqueous solution of cryoprotectant, glycerol or propane diol, was added. Main physico-chemical parameters of the used glycerol were as follows: boiling temperature at 760 mm Hg was 290°C, relative density at 20°C equaled 1.2613 g/cm<sup>3</sup>, light refractive index at 20°C corresponded 1.4740. The used in the work propane diol was additionally purified by distillation. Its main physico-chemical parameters were as follows: boiling point at 760 mm Hg was 188°C, relative density at 20°C made 1.035–1.040 g/cm<sup>3</sup>, light refractive index at 20°C corresponded 1.431–1.433. The container was made of composite polyimide-PTFE film [10] by welding and appeared as a flat rectangle of 15×40 mm size, which was specified by the biosensor dimensions. According to the process flow the container is to be firstly welded along three sides, one of the smaller sides to remain intact for further filling with cryoprotectant solution. After placing the biosensor inside and filling with 60% aqueous solution of glycerol or 1,2-propanediol (about 0.5 ml) the container thickness is ~2 mm (Fig. 1). Afterwards the unwelded side is to be finally sealed off with specially designed device, the container to be

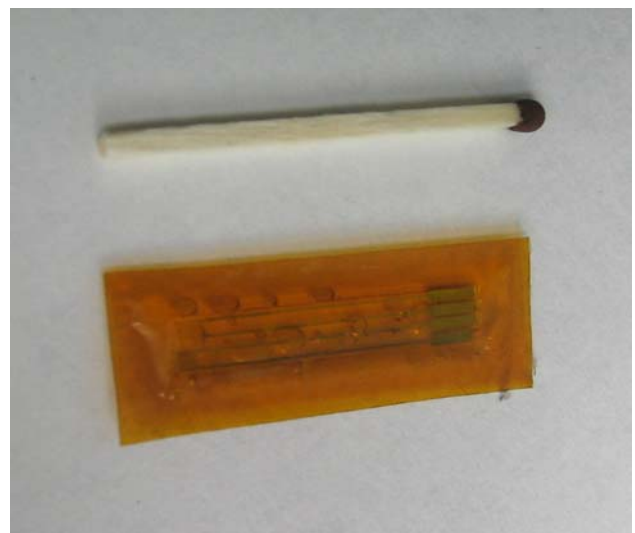
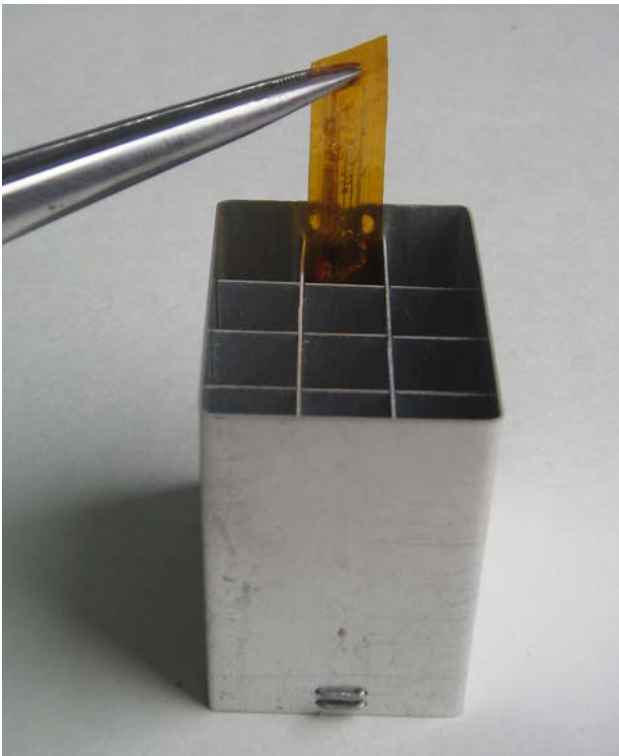


Рис.1. Контейнер із біосенсором всередині.

Fig. 1. Container with biosensor inside.







**Рис. 2.** Прямокутна касета для охолодження біосенсорів до помірно низьких температур.

**Fig. 2.** Rectangular cassette for cooling biosensors down to moderately low temperatures.

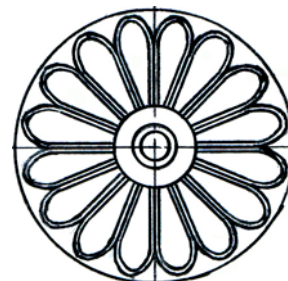
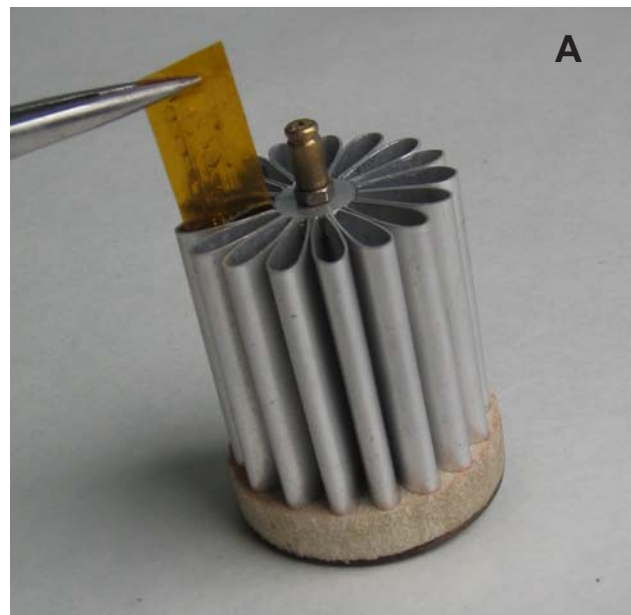
но легку прямокутну алюмінієву касету з 12 комірками (рис. 2), розмірами 50×37×55 мм і вагою 25 г. Касету розділено внутрішніми стінками на квадратні комірки, в які по діагоналі вкладають контейнери. Для зберігання кількох біосенсорів кожний з них окремо занурюють у плівковий контейнер, а потім усі контейнери розміщують у касеті з комірками.

Касета-холдер для повільного охолодження контейнерів із біосенсорами до  $-196^{\circ}\text{C}$  – циліндр діаметром 46 мм та висотою 52 мм, складений із згорнутих особливим чином 17 алюмінієвих пластин (рис. 3, А). Зверху конструкція має вигляд квітки з однаковими «пелюстками-комірками», які розташовані за центральною симетрією для створення у всіх комірках однакових температурних умов (рис. 3, В). Суцільно приєднане кругле дно та кришка касети з термоізолюючого матеріалу запобігають теплообміну з торців касети. У газовому середовищі посудини Дьюара зі зрідженим азотом, в яку занурюється касета, присутній значний градієнт температур (від близької до кімнатної – зверху, до температури рідкого азоту – над дзеркалом рідини) і температура біля нижньої частини касети може суттєво відрізнятись від температури біля верхньої. Запропонована конструкція касети

placed then into the cassette holder and cooled with  $1-3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  rate down to  $-196^{\circ}\text{C}$  (or down to  $-80^{\circ}\text{C}$ ). This cooling rate provides higher preservation of structural and functional state of glucose oxidase as well as integrity of electrochemical transducer [2]. Then the container is to be stored in the low temperature bank at either  $-196$  or  $-80^{\circ}\text{C}$ .

To store the biosensors after slow cooling at  $-80^{\circ}\text{C}$  there was designed a lightweight (25 g) aluminum cassette with 12 cells (Fig. 2). This is of a rectangular shape and has dimensions of  $50\times 37\times 55$  mm. Cassette is divided by means of inner walls to form square cells, wherein the containers are diagonally placed. To store several biosensors, each of them is to be separately sealed into the film container, which is to be then placed into the cassette with cells.

Cassette holder for slow cooling of the containers with biosensors down to  $-196^{\circ}\text{C}$  is a cylinder of 46 mm diameter and 52 mm height, made of 17 specially rolled aluminum plates (Fig. 3A). A top view of the design represents a ‘flower’ with equal petal-like cells, located



**Рис. 3.** Циліндрична касета для керованого охолодження: **А** – загальний вид; **В** – вид зверху.

**Fig. 3.** Cylindrical cassette for controlled cooling: **A** – general view; **B** – top view.





**Рис. 4.** Зовнішній вигляд пристрою для керованого охолодження контейнерів з біосенсорами на посудині Дьюара.

**Fig. 4.** External view of the device for controlled cooling the containers with biosensors on Dewar vessel.

забезпечує охолодження тільки з боків, при цьому її алюмінієві стінки, завдяки високій теплопровідності, ефективно вирівнюють температуру по висоті, а також радіально.

Пристрій, розроблений для повільного охолодження контейнерів з біосенсорами, використовується з посудинами Дьюара типу Х-5 («Темет», Україна) без додаткової модифікації (рис. 4). Механізм пристрою складається з трьох основних частин: шасі, блока «мотор-редуктор» та штанги, на якій встановлена касета з контейнерами (рис. 5). Особливість конструкції – наявність «контейнера-свідка» 23 на нижній стороні кришки 19, який ідентичний тим, що використовуються для заморожування біосенсорів. Його загерметизовано після введення всередину вимірювального спаю термопари 22, який перед тим проведено крізь порожній шток 1, отвір 20 у нижньому кінці штока та отвір 21 у кришці 19. «Контейнер-свідок» закріплено так, що після фіксації касети-холдера він розміщується у комірці так само, як й інші контейнери. Температуру всередині «контейнера-свідка» можна вважати такою ж, як і в інших контейнерах.

centrosymmetrically to maintain the same temperature conditions in all the cells (Fig. 3B). Insulated round bottom and cover of the cassette are tightly connected and prevent a heat transfer from the cassette ends. Gaseous environment of Dewar vessel with liquid nitrogen, wherein the cassette is immersed, has a significant temperature gradient (in a top there is almost 'room temperature' and the temperature of liquid nitrogen is above the liquid mirror), so the temperature at the lower part of the cassette may differ considerably from the temperature at the top. The proposed design of cassette provides cooling solely along the sides, moreover, the aluminum walls due to a high thermal conductivity effectively allocate the temperature vertically and radially.

The device for slow cooling of the containers with biosensors is designed to fit Dewars of H-5 type (Temet, Ukraine) without any additional modification (Fig. 4). The mechanism of the device consists of three main parts: chassis, 'motor-reducer' block and the rod holding the cassette with containers (Fig. 5). The design feature is the presence of spectacor container 23 located on lower part of cap 19, which is identical to those used for cooling the biosensors. It is sealed after being placed inside of a measuring junction of thermocouple 22, pulled previously through the rod 1, orifice 20 in lower end of the rod and the orifice 21 in the cap 19. Spectacor container is fixed in such way that after fixing the holder cassette it is located in a cell equally to other containers. The temperature inside the spectacor container could be considered the same as for other containers.

The principle of the device operation is described below.

Base 5 of the device is mounted on a cryogenic Dewar vessel H-5 neck and fixed with screws 8. Here-with the revolute arm 7 crosses the center orifice 6 and prevents an accidental falling of the holder 15 inside a cryogenic Dewar vessel. When holder 15 is detached from the device the containers with biosensors are placed into the cells 16 leaving one of them free. When attaching to the device, the holder 15 is pushed from the bottom with fitting free cell to the spectacor container 23, and getting cylinder finger 18 into the orifice 1 of the rod 1, and fixing them with tightly closing cap 19. Owing to the material (stainless steel) and design the rod has a very low thermal conductivity and mini-mally affects the temperature within the cassette. Thus, the temperature in the spectacor container is the same as in other containers. By means of the revolute arm 7 the central orifice 6 is opened, afterwards electric motor 12 starts to operate. The rod 1 is moving downwards and locates the holder 15 into a cryogenic vessel. The velocity of the holder 15 is being



Далі подано опис принципу роботи даного пристрою.

Основою 5 пристрій установлюють на горловину криогенної посудини Дьюара Х-5 й закріплюють гвинтами 8. При цьому поворотний важіль 7 перетинає центральний отвір 6 і запобігає випадковому падінню холдера 15 всередину криогенної посудини Дьюара. В комірки 16 холдера 15, від'єданого від пристрою, поміщають контейнери з біосенсорами так, щоб одна із комірок 16 залишалася вільною. При установці в пристрій холдер 15 вільною коміркою насувають знизу на «контейнер-свідок» 23, попадаючи циліндричним штирем 18 в отвір штока 1, і фіксують в ньому щільно закритою кришкою 19. Завдяки матеріалу (нержавіюча сталь) і конструкції шток має незначну теплопровідність і мінімально впливає на температуру всередині касети. Таким чином, температура в «контейнері-свідку» така ж, як і в інших контейнерах. Поворотним важілем 7 звільняється центральний отвір 6, після чого включається електродвигун 12. Шток 1, переміщуючись униз, занурює холдер 15 всередину криогенної посудини. Швидкість занурення холдера 15 та відповідно швидкість охолодження контейнерів задається електричним блоком і контролюється показаннями термопари 22. При досягненні необхідної температури електродвигун 12 перемикається на підйом та у крайньому верхньому положенні штока 1 вимикається. Після виконання програми заморожування касета-холдер легко від'єднується від пристрою, контейнери виймають і переносять до низькотемпературного сховища, а холдер після нетривалого відігрівання й сушіння готовий до подальшої роботи.

При зберіганні у сховищі біосенсори повинні бути занурені у рідкий азот.

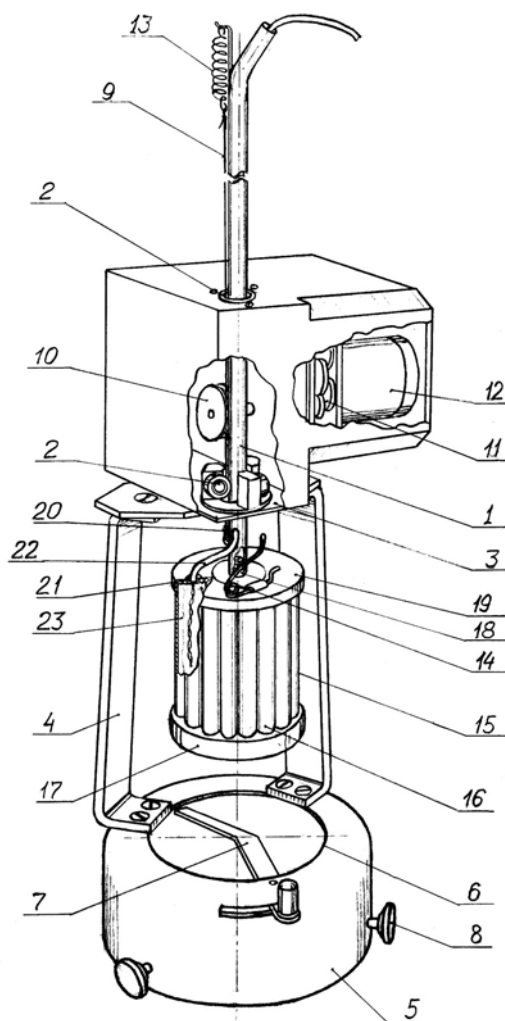
Для розморожування контейнери з біосенсорами відігрівають на водяній бані при 20°C до повного розтавання середовища криоконсервування у плив-

plunged and, correspondingly, the rate of containers cooling is set with electric unit and controlled by a thermocouple 22 readings. When reaching the desired temperature, the electric motor 12 is switched to lift and stops after reaching upper limit of the rod 1. After finishing the freezing program the holder cassette is easily detached from the device, the containers are pulled out and could be transferred to a low-temperature tank and the holder after a short warming and drying is ready for further work.

During storage in a tank the biosensors should be submerged into liquid nitrogen.

Thawing of the containers with biosensors is performed by warming in a water bath at 20°C until a complete thawing of cryopreservation medium in a film container, then it is cut with scissors, the biosensor is pulled out by means of tweezers, washed in 10 mM phosphate buffer solution for 30 min with three-fold buffer solution changing.

The development of described cryopreservation technology was accompanied with permanent control



**Рис. 5.** Схема пристрою охолодження контейнерів з біосенсорами: 1 – рухливий шток; 2 – підшипникова обойма; 3 – корпус; 4 – кронштейн; 5 – основа; 6, 20, 21 – отвори; 7 – поворотний важіль; 8 – фіксуючий гвинт; 9 – тросик; 10 – шків; 11 – редуктор; 12 – електродвигун; 13 – пружина; 14 – пружинний фіксатор; 15 – холдер; 16 – секція ячейки; 17 – термоізолюючий диск; 18 – штир; 19 – кришка холдера; 22 – вимірювальний кінець термопари; 23 – «контейнер-свідок».

**Fig. 5.** Diagram of the device for cooling the containers with biosensors: 1 – rod; 2 – bearing hoop; 3 – body frame; 4 – bracket; 5 – base; 6, 20, 21 – orifices; 7 – revolute arm; 8 – fixing screw; 9 – cable thread; 10 – pulley; 11 – reducing gear; 12 – electric motor; 13 – spring; 14 – spring fixative; 15 – holder; 16 – section of the cell; 17 – thermoinsulating disk; 18 – finger contact; 19 – holder cap; 22 – measuring junction of thermocouple; 23 – spectacor container.



ковому контейнері, після чого його розрізають ножицями, пінцетом витягують біосенсор, відмивають у 10 мМ фосфатному буферному розчині протягом 30 хв з трикратною заміною рідини.

При розробці описаної технології кріоконсервування на всіх етапах здійснювали контроль за роботою біосенсорів на основі ферментів (наприкладі глюкозооксидази), для чого їх занурювали у комірку об'ємом 2 мл з 10 мМ фосфатним буферним розчином, рН 7,4. Відгук біосенсорів на додавання розчину 1 мМ глюкози реєстрували за допомогою установки для роботи з кондуктометричними ферментними біосенсорами [7]. Якщо величина відгуку складала близько 70% від відгуку біосенсора до кріоконсервування і не змінювалася після відмивання та наступних трьох додавань 1 мМ розчину глюкози, біосенсор вважали робочим. Величину відгуку біосенсора з глюкозо-оксидазою до заморожування на введення 1 мМ розчину глюкози у калій-фосфатному буфері приймали за 100%.

Як було зазначено вище, для захисту біосенсорів при заморожуванні та відігріванні використовували 60%-й водний розчин гліцерину або 1,2-пропандіолу [2]. Як видно з таблиці, інкубація біосенсорів у розчинах кріопротекторів з триразовим відмиванням буферним розчином протягом 30 хв незначно погіршує величину відгуку біосенсора. Досліджували вплив повільного і швидкого заморожування та наступного відігрівання в середовищах (що містили або не містили кріопротектори) на відгук біосенсорів. Результати свідчать, що після швидкого заморожування біосенсорів на основі глюкозооксидази і наступного відігріву відгуку не було, в той час як при використанні повільного заморожування він складав ( $23 \pm 4$ )%. Після повільного заморожування біосенсорів у середовищі з кріопротекторами та вігріву їх відгук знаходився у межах, що забезпечують ефективну роботу пристроїв. Величину відгуку досліджували також через тиждень, 3, 6 місяців, 1 та 2 роки зберігання при відповідних режимах заморожування. Біосенсори зберігали також при 4°C як з дослідженими кріопротекторами, так і без них. В усіх випадках після зберігання при цій температурі відгук не реєструвався. Результати наших досліджень свідчать, що біосенсори на основі ферментів (наприкладі глюкозооксидази) можуть зберігатися 2 роки у рідкому азоті (-196°C) або 1 рік при -80°C у 60%-му розчині гліцерину без суттєвої втрати ферментної активності (таблиця).

Таким чином, спираючись на проведені раніше експериментальні дослідження зі збереження стабільної активності ферментів після дії низьких

of the enzyme-based biosensors operation (glucose oxidase based biosensors as a case study). To do this the devices were immersed into a 2 ml well with 10 mM phosphate buffer saline, pH 7.4. Response of biosensors to the supplementing of 1 mM glucose solution was recorded by experimental assembly for conductometric enzyme-based biosensors [7]. If the response of biosensor was about 70% of the value before cryopreservation and it did not change after washing and the following three supplementations of 1 mM glucose, the biosensor was considered as valid one. As 100% was assumed the response of the glucose oxidase based biosensor prior to freezing to the supplementing of 1 mM glucose solution in potassium phosphate buffer saline.

As it was mentioned above, to protect the biosensors during freeze-thawing there was used 60% aqueous solution of glycerol or 1,2-propanediol [2]. The incubation of biosensors in solutions of cryoprotectants with triple washing with the buffer solution for 30 min slightly decreased the response of biosensor (Table). The effect of slow and rapid freezing as well as subsequent thawing in the media with and without cryoprotectants on response of biosensors was investigated. The results

Вплив умов обробки/зберігання на відгук біосенсорів  
Biosensors response following treatments/storage

Досліджувані зразки Samples	Відгук біосенсора, % Biosensor response, %
Контроль (без обробки) Non-treated control	100
Експозиція в 60%-му розчині гліцерину Exposure in 60% glycerol solution	91 ± 5
Експозиція в 60%-му розчині 1,2-пропандіолу Exposure in 60% 1,2-propane diol solution	95 ± 5
Зберігання протягом 2 років при -196°C у 60%-му розчині гліцерину Storage during 2 years at -196°C in 60% glycerol solution	65 ± 8
Зберігання протягом року при -80°C у 60%-му розчині гліцерину Storage during 2 years at -80°C in 60% glycerol solution	75 ± 8
Зберігання протягом року при -80°C у 60%-му розчині 1,2-пропандіолу Storage during 2 years at -80°C in 60% 1,2-propane diol solution	79 ± 8
Зберігання протягом року при 4°C Storage during 1 year at 4°C	0

**Примітки:** відгук біосенсорів наведено у відсотках від контролю – біосенсорів, що не були піддані обробці; дані є середнім від 7 паралельних повторів ± стандартна помилка середнього.

**Notes:** response of biosensors is expressed in percents of the response of the control non-treated biosensors; the data are mean ± standard error of the mean of 7 parallel experiments.



температурах створено підходи, які забезпечують зберігання біосенсорів на основі глюкозооксидази за температури зрідженого азоту протягом 2 років і протягом 1 року за температури  $-80^{\circ}\text{C}$  без істотного впливу на їхню функцію. Запропоновані способи довгострокового зберігання ферментних біосенсорів дали можливість створити технологію зберігання біосенсорів на основі глюкозооксидази, яка дозволяє проводити операції з заморожування, зберігання й відігрівання біосенсорів. Розроблено й виготовлено зразки контейнерів, касет-холдерів, а також устаткування для заморожування біосенсорів за необхідними режимами.

### Література

1. Биосенсоры: основы и приложения / Под ред. Э. Тернера, И. Карубе, Дж. Уилсона. – М.: Мир, 1992. – 615 с.
2. Грищенко В.І., Нардід О.А., Розанова К.Д. та ін. Низькотемпературна стабілізація глюкозооксидази в складі біологічного сенсора // Біополімери і клітина. – 2006. – Т. 22, №3. – С. 236–242.
3. Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів. – Київ: Наук. думка, 2006. – 256 с.
4. Мосолов В.В., Соколова Е.В. Взаимодействие гликолей и глицерина с активным центром трипсина и химотрипсина // Докл. АН СССР. – 1972. – Т. 207, №1. – С. 91–93.
5. Науменко Е.И., Розанова Е.Д. Изучение механизмов криоповреждения изолированной цитохромоксидазы // Вторая всесоюзная конференция по теоретическим и прикладным вопросам криобиологии, 9–11 октября 1984 г.: Тезисы докл. – Харьков, 1984. – С. 61.
6. Розанова Е.Д., Моисеев В.А., Науменко Е.И. Влияние замораживания-отогрева на структуру и функцию цитохромоксидазы // Укр. биохим. журнал. – 1985. – Т. 57, №1. – С. 61–64.
7. Солдаткін О.П. Розробка наукових та технологічних засад створення електрохімічних біосенсорів для потреб медицини, біотехнології та охорони навколишнього середовища: Автореф. дис. ... докт. біол. наук. – К., 1998. – 40 с.
8. Юрченко Т.Н., Козлова В.Ф., Скорняков Б.А. Влияние криопротекторов на биологические системы. – К.: Наук. думка, 1989. – 238 с.
9. Пат. України №23507 МПК F25B19/00. Пристрій для заморожування біоматеріалів / Д.О. Мангасаров, О.А. Нардід, К.Д. Розанова, М.І. Щетинський; заявл. 22.01.2007; надрук. 25.05.2007, Бюл. №7.
10. Пат. України №70805А МПК А01N1/12. Контейнер для низькотемпературного консервування біологічних об'єктів / В.І. Грищенко, О.Т. Ходько, О.С. Прокопюк та ін.; заявл. 29.12.2003; надрук. 15.10.2004, Бюл. №10.
11. Climent P.V., Serralheiro M.L.M., Rebelo M.I.F. Development of a new amperometric biosensor based on polyphenoloxidase and polyethersulphone membrane // Pure Appl. Chem. – 2001. – Vol. 73, №12. – P. 1993–1999.
12. Korpan Y.I., Dzyadevich S.V., Zharova V.P., El'skaya A.V. Conductometric biosensor for ethanol detection based on whole yeast cells // Укр. біохім. журнал. – 1994. – Т. 66, №1. – С. 78–82.
13. Market C. L. Lactate dehydrogenase isozymes: Dissociation and recombination of subunits // Science. – 1963. – Vol. 140, №3573. – P. 341–350.

testified that after rapid freezing of glucose oxidase-based biosensors and subsequent warming no response was found while after using slow freezing it was  $(23 \pm 4)\%$ . After slow freezing of biosensors in the medium with cryoprotectants their response was within the limits, considered as providing an effective operation of biosensors. The response was also investigated following 1 week, 3, 6 months and 1 and 2 years of storage after using corresponding freezing regimens. Biosensors were also stored at  $4^{\circ}\text{C}$  both with or without the cryoprotectants. In all the cases, no response was found following storage at this temperature. Our results indicate that enzyme-based biosensors (glucose oxidase based biosensors as a case study) could be stored for 2 years in liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) or during a year at  $-80^{\circ}\text{C}$  in 60% glycerol solution without significant loss of enzyme activity (Table).

Thus, based on preliminary conducted experimental research on preservation of stable activity of enzymes after exposure to low temperatures we represented in this paper the approaches to storage of glucose oxidase-based biosensors at the temperature of liquid nitrogen for two years and during a year at  $-80^{\circ}\text{C}$  without significant loss of their function. Proposed methods of long-term storage of enzyme-based biosensors enabled to develop a technological process of glucose oxidase-based biosensors storage, which included freezing, storage and thawing of biosensors. The model containers, cassette holders and equipment for freezing biosensors were designed and produced to provide to the elaborated regimens.

### References

1. Biosensors: bases and applications/ Ed. by E. Turner, I. Karube, J. Wilson. – Moscow: Mir, 1992. – 615 p.
2. Grischenko V.I., Nardid O.A., Rozanova K.D. et al. Low temperature stabilization of glucose oxidase as component of biological sensor // Biopolymery I Klityna. – 2006. – Vol. 22, N3. – P. 236–242.
3. Dzyadevich S.V., Soldatkin O.P. Scientific and technological grounds of creating miniature electrochemical biosensors. – Kyiv: Naukova Dumka, 2006. – 256p.
4. Mosolov V.V., Sokolova E.V. Interaction of glycols and glycerol with active center of trypsin and chymotrypsin // Doklady AN SSSR. – 1972. – Vol. 207, N1. – P. 91–93.
5. Naumenko E.I., Rozanova E.D. Study of mechanisms of cryodamage of isolated cytochrome oxidase// The Second All-Union Conference on Theoretical and Applied Questions of Cryobiology, October 9–11, 1984: Proceeding. – Kharkov, 1984. – P. 61.
6. Rozanova E.D., Moiseyev V.A., Naumenko E.I. Effect of freeze-thawing on structure and function of cytochrome oxidase // Ukr. Biokhim. Zhurnal. – 1985. – V. 57, N1. – P. 61–64.
7. Soldatkin O.P. Development of scientific and technological bases for creation of electrochemical biosensors for demands of medicine, biotechnology and environmental protection: Author's abstract ...Doct. Biol. Sci. – Kiev, 1998. – 40p.





14. Pancrasio J.J., Whelan J.P., Borkholder D.A. et al. Development and application of cell-based biosensors // *Ann. Biomed. Eng.* – 1999. – Vol. 27. – P. 697–711.
15. Sanders C.A., Rodriguez M.Jr., Greenbaum E. Stand-off tissue based biosensors for the detection of chemical warfare agents using photosynthetic fluorescence induction // *Biosens. Bioelectron.* – 2001. – Vol. 16. – P. 439–446.
16. Santos A.S., Freire R.S., Kubota L.T. Highly stable amperometric biosensor for ethanol based on Meldola's blue adsorbed on silica gel modified with niobium oxide // *J. Electroanal. Chem.* – 2003. – Vol. 547, Issue 2. – P. 135–142.
17. Whittman J.H., Rosano H.L. Effects of freeze-thaw process on amylase // *Cryobiology.* – 1973. – Vol. 10, №3. – P.240–243.
8. Yurchenko T.N., Kozlova V.F., Skorniyakov B.A. Effect of cryoprotectants on biological systems. – Kiev: Naukova Dumka, 1989. – 238p.
9. Patent of Ukraine N23507 IPC F25B19/00. Device for freezing biomaterials/ D.O. Mangasarov, O.A. Nardid, K.D. Rozanova et al. Appl. 22.01.2007; Publ. 25.05.2007, Bul. N7.
10. Patent of Ukraine N70805A IPC A01N1/12. Container for low temperature preservation of biological objects/ V.I. Grischenko, O.T. Khodko, O.S. Prokopyuk et al. App. 29.12. 2003; Publ. 15.10.2004, Bul. 10.
11. Climent P.V., Serralheiro M.L.M., Rebelo M.I.F. Development of a new amperometric biosensor based on polyphenoloxidase and polyethersulphone membrane // *Pure Appl. Chem.* – 2001. – Vol. 73, N12. – P. 1993–1999.
12. Korpan Y.I., Dzyadevich S.V., Zharova V.P., El'skaya A.V. Conductometric biosensor for ethanol detection based on whole yeast cells // *Ukr. Biokhim. Zhurnal.* – 1994. – Vol. 66, N1. – P. 78–82.
13. Market C. L. Lactate dehydrogenase isozymes: Dissociation and recombination of subunits // *Science.* – 1963. – Vol. 140, N3573. – P. 341–350.
14. Pancrasio J.J., Whelan J.P., Borkholder D.A. et al. Development and application of cell-based biosensors // *Ann. Biomed. Eng.* – 1999. – Vol. 27. – P. 697–711.
15. Sanders C.A., Rodriguez M.Jr., Greenbaum E. Stand-off tissue based biosensors for the detection of chemical warfare agents using photosynthetic fluorescence induction // *Biosens. Bioelectron.* – 2001. – Vol. 16. – P. 439–446.
16. Santos A.S., Freire R.S., Kubota L.T. Highly stable amperometric biosensor for ethanol based on Meldola's blue adsorbed on silica gel modified with niobium oxide // *J. Electroanal. Chem.* – 2003. – Vol. 547, Issue 2. – P. 135–142.
17. Whittman J.H., Rosano H.L. Effects of freeze-thaw process on amylase // *Cryobiology.* – 1973. – Vol. 10, N3. – P.240–243.

