

Ольга ДЕМКІВ¹, Богдан ВУС², Михайло ГОНЧАР²

АМПЕРОМЕТРИЧНІ БІОСЕНСОРИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ФОРМАЛЬДЕГІДУ

¹Відділ аналітичної біотехнології, Інститут біології клітини НАН України

²Національний університет “Львівська Політехніка”

Описано клітинний і ензимний амперометричні біосенсори для аналізу формальдегіду за використання як біоелементів клітин генно-інженерного продуцента формальдегіддегідрогенази й очищеного препарату формальдегіддегідрогенази. Для них досліджено біоаналітичні характеристики. Лінійний діапазон для ензимного біосенсора простежується для концентрації формальдегіду в межах 2 – 20 мМ, для клітинного, нижчий — у межах 1–6 мМ. Обидва біосенсори виявили високу селективність до формальдегіду, даючи досить низькі відгуки на інші альдегіди. Ензимний біосенсор стабільний при зберіганні протягом 15 днів, а операційна стабільність біосенсора зберігається протягом 20 год. Цей біосенсор було використано для аналізу формальдегіду в реальних зразках. Показано добру кореляцію результатів, отриманих біосенсорним методом, порівняно з іншими методами аналізу.

Опрацювання надійних і простих методів для швидкого, селективного та чутливого виявлення і кількісного аналізу певних речовин у промислових та харчових продуктах, довіллі та контролю багатьох технологічних процесів є актуальною проблемою хімії, біохімії та біотехнології. Важливим у цьому напрямі є опрацювання методів аналізу токсичних речовин, які нагромаджуються в довіллі або ж споживчих товарах. Серед таких розповсюджених і небезпечних речовин є формальдегід (ФА), який уже став супутником не тільки хімічних виробництв, а й повітря офісів, житлових приміщень і навіть харчових продуктів [1, 2].

ФА шкідливо впливає на здоров'я людини: на центральну нервову систему, кров, імунну систему [3], може стати причиною сліпоти та респіраторних захворювань, спричиняє алергічні реакції та порушення росту [4]. ФА є одним з хімічних медіаторів апоптозу та належить до категорії канцерогенів [3]. ФА — токсична сполука і водночас універсальний природний метаболіт, який утворюється в процесі життєдіяльності клітин. Його використовують у промисловості для виробництва пластмас як стерилізуючий агент у фармакології, медицині та сільському господарстві. В дослідженнях останнього десятиліття показано наявність ФА в фруктах, овочах, м'ясі, в рибних продуктах, а також у біологічних рід-

нах людини і озонованій питній воді [1, 2].

Сьогодні в літературі описано низку нових підходів для кількісного та якісного аналізу ФА, тобто ферментативно-хромогенні системи [5, 6], газова і рідинна хроматографія, флуориметрія, рефрактометрія та спектрофотометрія [2, 9], амперометричний сенсор із застосуванням інжекційної техніки [7], оптичний біосенсор [8] і ферментний біосенсор [1] на базі рН-чутливого транзисторного перетворювача. У багатьох з них є недоліки, які зумовлюють пошук нових сучасних високочутливих, селективних і дешевих методів моніторингу ФА в середовищах доквілля та харчових продуктах, у тім числі біосенсорних і ензиматичних. Мета нашої праці — розробити нові амперометричні біосенсори, селективні до ФА, на основі формальдегіддегідрогенази (ФдДГ), виділеної з клітин рекомбінантного штаму *Hansenula polymorpha*, а також інтактних клітин генно-інженерного надпродуцента ФдДГ.

Матеріали і методи

Мікроорганізми та їх культивування. Ми використовували клітини генно-інженерного продуцента ФдДГ Tf 11 – 6 дріжджів *H. polymorpha*, який одержали раніше [10]. Дріжджі вирощували на синтетичному середовищі такого складу (г/л): KH_2PO_4 — 1; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 3.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0.5; CaCl_2 — 0.1; дріжджовим екстрактом — 0.5 та зі стандартним вмістом мікроелементів [10]. Як джерело вуглецю використовували метанол (1%), як джерело азоту — сульфат амонію. Клітини вирощували у колбах об'ємом 250 мл на круговому шейкері (200 об./хв) при 28°C.

Формальдегіддегідрогеназа. Для виділення ФдДГ з клітин продуцента Tf 11 – 6, яка охоплювала двостадійну іонообмінну хроматографію безклітинних екстрактів за схемою, яку ми розробили [11]. Отриманий препарат з активністю 12 од/мг використовували для конструювання біосенсора.

Формування біочутливого елемента. Створюючи біосенсор, робочим електродом слугував графітовий стержень (RW001, діаметр 3.05 мм, Ringsdorff Werke), поміщений у скляну трубку та герметично залитий епоксидним клеєм. Робочу поверхню диска відполіровували наждачним папером з різним діаметром частинок і платинізували. При конструюванні ензимного біосенсора перший (глибинний) шар чутливої мембрани формували шляхом іммобілізації ФдДГ, отриманої з клітин трансформанта Tf 11 – 6, в полімерному шарі катодного електроосаджувального полімеру CP58. Для цього 2 мкл суспензії ФдДГ (15 од./мл) наносили на поверхню робочого електрода. Після підсихання суспензії ФдДГ вносили 5 мкл розчину катодного полімеру (CP58), який осаджували на поверхні електрода з використанням потенціостатичних імпульсів величиною – 1200 мВ тривалістю 0.2 с з інтервалом 5 с [12]. Полімерну плівку формували упродовж електрохімічного окислення води в результаті депротонізації і пов'язаної з цим преципітації катодного полімеру. Іммобілізація ФдДГ відбувалась у результаті співосадження молекул білка і полімеру CP58. Перед початком кожної наступної процедури електрод промивали 50 мМ фосфатним буфером, рН 8.0. Другий шар формували з молекул NAD^+ і глутатіону. Для цього 25 мМ розчини наносили на перший шар мембрани по 5 мкл, фіксували за допомогою нафіонової мембрани (5 мкл

1 % нейтралізованого розчину нафіону в етанолі).

Створюючи клітинний біосенсор, перший (глибинний) шар чутливої мембрани формували шляхом іммобілізації клітин трансформанта Tf 11 – 6 в полімерному шарі катодного електроосаджувального полімеру CP58. Для цього на поверхню платинізованого графітового електрода наносили 5 мкл суспензії клітин (0.1 мг/мл), в 50 мМ фосфатному буфері, рН 8.0. Після підсихання суспензії клітин вносили 5 мкл розчину катодного полімеру (CP58), який осаджували на поверхні електрода за використанням потенціостатичних імпульсів величиною -1200 мВ тривалістю 0.2 с з інтервалом 5 с. Другий шар формували з молекул NAD⁺ і глутатіону. Для цього 25 мМ розчини наносили на перший шар мембрани по 5 мкл, фіксували за допомогою нафіонової мембрани (5 мкл 1 % нейтралізованого розчину нафіону в етанолі). Нафіонову мембрану формували протягом 20 – 25 хв при +4°C. Усі хімічні розчини та хімічні реагенти готували з використанням високо очищеної деіонізованої води.

Вільнодифундуючі медіатори. Використовували гексаціаноферат калію(III) (1 мМ), метиленовий синій (0.5 мМ) і феназинетосульфат (1 мМ) розчинені в 20 мМ фосфатному буфері, рН 8.2. Фероцен розчиняли в ацетоні. Для приготування сенсора на основі фероцену як медіатора, наносили 4 мкл 10 мМ розчину на поверхню електрода перед електроосадженням катодного полімеру. Електроосадження берлінської блакиті проводили за допомогою циклічної вольтамографії (10 циклів з 0.4 до 1.3 В зі швидкістю 10 мВ с⁻¹ в 5 мМ розчині K₃[Fe(CN)₆], що містив 5 мМ FeCl₃ і 10 мМ HCl) [13]. Після утворення плівки електрод промивали в буфері та надалі використовували.

Вимірювання проводили при кімнатній температурі, використовуючи три електроди: срібло-хлорсрібний електрод порівняння Ag/AgCl/KCl (3 М), допоміжний стержневий платиновий та робочий електрод, які поміщали в інтенсивно перемішуваний розчин (10 мл 20 мМ фосфатного буферу, рН 8.0) у скляній комірці об'ємом 50 мл. Після досягнення стабільного базового сигналу в комірку вносили певний аналіт. Амперометричні дослідження проводились за допомогою потенціостату, з'єданого з персональним комп'ютером для реєстрації та обробки результатів.

Методи аналізу формальдегіду. Для аналізу ФА використовували три хімічні методи, використовуючи: хромотропову кислоту [14], 3-метил-2-бензотіазолінонгідразон-гідрохлорид (МВТН) [15], пурпальд [16], а також ензиматичний-фотометричний метод, який ми розробили [11].

Результати та обговорення

Наші дослідження скеровані на розробку нових методів аналізу ФА, зокрема за використання ФдДГ та генно-інженерного продуцента цього ферменту. У попередніх працях ми описали розроблений ензиматичний метод аналізу ФА [11]. Важливо було порівняти його з іншими методами моніторингу вмісту ФА. Тому ми вирішили при конструюванні амперометричних біосенсорів, чутливих до ФА, як аналітичний інструмент використовувати клітини рекомбінантного продуцента ФдДГ і виділений препарат високо очищеної ФдДГ.

ФдДГ проводить окислення комплексу ФА з глутатіоном до форміл-глутатіону, і під час реакції відбувається відновлення NAD⁺ до NADH.

Безпосередньо переносити електрони на електрод ФдДГ не здатна, тому транспорт електронів відбувається за допомогою медіаторів. Для ензиматичного біосенсора ми провели скринінг різних медіаторів: вільнодіфундуючих медіаторів $K_3[Fe(CN)_6]$, метиленовий синій, феназинетосульфат), а також електроосаджуваних медіаторів (фероцен, берлінська блакить, катодний осмій-вмісний полімер CP58Os). Серед досліджуваних медіаторів найбільший відгук простежували при використанні осмій-вмісного полімеру CP58Os [12].

Осмій-вмісні полімери забезпечують медіаторну функцію та можливість іммобілізації біочутливого елемента шляхом катодного електроосадження. Молекули NAD^+ і глутатіону, які потрібні для функціонування ФдДГ, фіксували за допомогою іонних контактів на поверхні позитивно зарядженого катодного полімеру і додатково нафійонової мембрани. Схематичне зображення архітектури амперометричних біосенсорів подано на рис. 1. За такою схемою конструювали ензимний і клітинний сенсори, де як біочутливий елемент використовували ензим або генно-інженерні клітини його надпродукта.



Рис. 1. Архітектура амперометричного біосенсора.

Для сконструйованих біосенсорів вивчали біоаналітичні характеристики (лінійний діапазон відгуку, чутливість, селективність). На підставі концентраційної залежності, зображеної на рис. 2, з'ясовано, що для ензимного біосенсора максимальна відповідь становить 250 ± 5.3 мкА для 3.05 мм (діаметр) електрода. Позірна константа Міхаеліса-Ментен (K_m) для формальдегіду становить 120 ± 5.3 мМ. Верхня межа лінійної області калібрувальної кривої для створеного біосенсора становить 20 мМ. Для клітинного біосенсора максимальна відповідь дещо нижча порівняно з ензимним сенсором і становить 143 ± 6.93 мкА для 3.05 мм (діаметр) електрода, константа Міхаеліса-Ментен (K_m) для формальдегіду становить 41.5 ± 4.4 мМ. Верхня межа лінійної області калібрувальної кривої для клітинного біосенсора становить 6 мМ, що в 3.3 раза нижче, ніж для

ензимного сенсора.

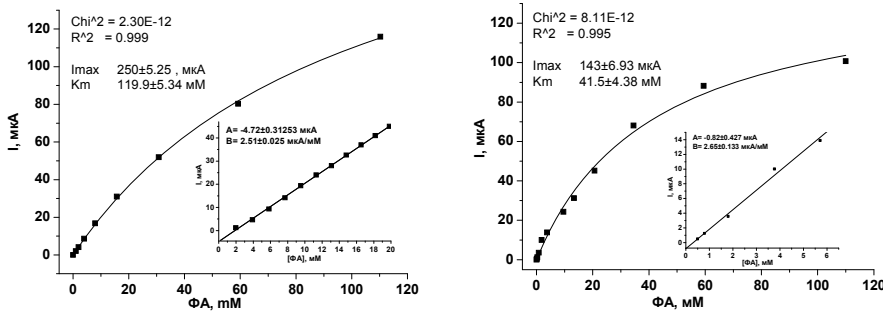


Рис. 2. Динаміка розвитку сенсорного сигналу при поступовому внесенні ФА для платинізованих графітових електродів: *CP58Os-NAD⁺-ФдДГ-глутатіон-нафін* (А) (зліва) і *CP58Os-NAD⁺-Tf 11-6-глутатіон-нафін* (справа).

Як з'ясувалось, значення K_m для ензимного та клітинного біосенсорів не збігаються з літературними даними про значення K_m для ФдДГ з метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* (0.21 мМ [17]), *Candida boidinii* (0.25 – 0.29 мМ [18]), *Pseudomonas putida* (2.1 мМ [19, 20]). Можливо, це зумовлено особливою архітектурою самого біосенсора, а саме проникністю мембрани.

Оптимальні умови функціонування біосенсорів: 20 мМ фосфатний буфер, рН -7.6–8.2, температура 45 – 50°C (рис. 3), що збігається з рН- і температурним-оптимумами для очищеного препарату ФдДГ [11].

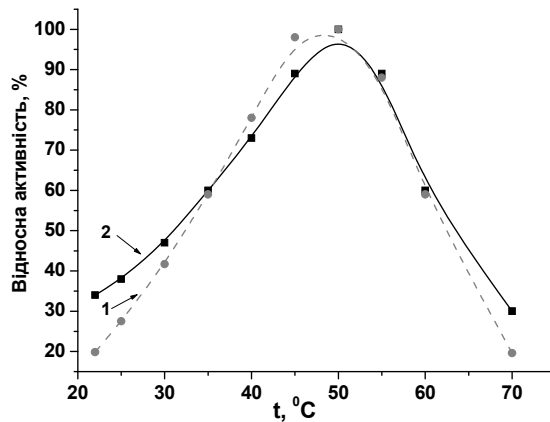


Рис. 3. Температурний оптимум для двох біосенсорів: *CP58Os-NAD⁺-Tf 11-6-глутатіон-нафін* (1) і *CP58Os-NAD⁺-ФдДГ-глутатіон-нафін* (2).

Важливою характеристикою біосенсора є його селективність. Досліджуючи селективність (рис. 4) розроблених біосенсорів, виявлено, що най-

більша спорідненість для ензимного та клітинного сенсорів відповідно простежується до ФА (100 %), менша — до метилглюксалу (9.12 і 5.31%), ацетальдегіду (5.1 і 2.6%), пропіональдегіду (1.89 і 0.54%), масляного альдегіду (0.93 і 0.23%). Низька селективність біосенсорів до альдегідів дає змогу більш селективно визначити вміст ФА в реальних зразках.

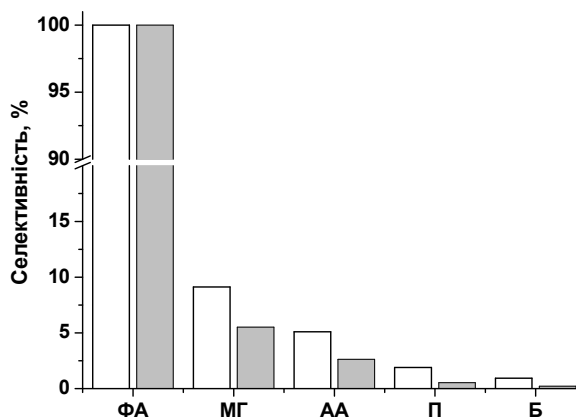


Рис. 4. Селективність біосенсорів з архітектурою: CP58Os-NAD⁺-ФдДГ-глутатіон-нафійон (□) і CP58Os-NAD⁺-клітини-глутатіон-нафійон (■) до альдегідів: ФА — формальдегід; МГ — метилглюксаль; АА — ацетальдегід; П — пропіональдегід; Б — масляний альдегід (у відсотках до сигналу на ФА).

Стабільність сконструйованого ензимного біоелектрода вивчали шляхом повторних вимірів сенсорного відгуку стосовно 7.7 мМ ФА протягом 18 діб (при 4°C у 20 мМ фосфатному буфері, рН 8.2). Падіння сигналу простежувалось тільки в 1.3 раза, що свідчить про високу стабільність біоелектродів при зберіганні (рис. 5).

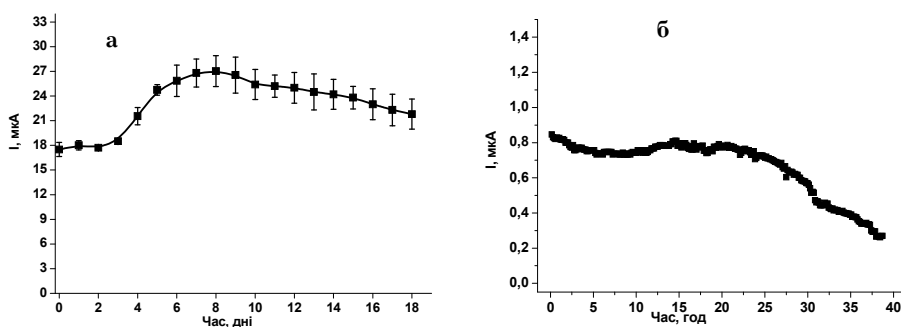


Рис. 5. Стабільність при зберіганні (а) та операційна (б) ензимного біосенсора CP58Os-NAD⁺-ФдДГ-глутатіон-нафійон.

Операційну стабільність (рис. 5) ензимного біосенсора досліджували за

допомогою інтегрованого в аналізатор “OLGA”(on-line general analyzer). Кожні 4 хв до комірки автоматично вносили порцію аналіту (зі швидкістю $5 \text{ мл}\cdot\text{хв}^{-1}$) і проводили реєстрацію відгуку на ФА. При внесенні 1 мМ розчину ФА величина відгуку біосенсора протягом 20 год не змінювалось, проте на 35-у годину вимірювання сигнал знизився в 2.1 раза. Отже, ензимний біосенсор має високу операційну стабільність.

За допомогою сконструйованого ензимного біосенсора ми проводили аналіз ФА в реальних зразках методом послідовного додавання ФА (див. табл.). Було показано, що дані біосенсорного аналізу добре корелюють із результатами, отриманими хімічними методами та ензиматичним методом [11], який ми розробили.

Таблиця

Аналіз ФА в реальних зразках методом послідовних додавань стандарту

Зразок/ Методи	Хімічні методи			Ензиматичні та біосенсорні методи	
	МВТН	пурпальд	хромотропова кислота	форматест	ФдДГ-біосенсор
	Концентрація ФА, М±m				
Формідрон	1.64 ±0.61	1.2±0.20	1.48±0.26	1.53±0.31	1.57±0.13
Дескотон	3.57±0.3	3.3±0.25	3.59±0.44	3.25±0.8	3.61±0.13
Формалін	12.6±0.73	–	14.0±0.81	13.5±0.7	13.6±0.6
Вакцина проти вірусної геморагічної хвороби кролів	0.038±0.003	0.043±0.002	0.029±0.005	0.042±0.004	0.041±0.005
Вакцина АДП-М (дифтерійно-правцева)	1.02±0.07 10^{-3}	1.24±0.08 10^{-3}	1.19±0.2 10^{-3}	0.50±0.09 10^{-3}	1.26±0.09 10^{-3}

Кінцеві висновки

При конструюванні амперометричних сенсорів використано осмій-вмісні полімери, які забезпечують медіаторну функцію і можливість іммобілізації біочутливого елемента сенсора шляхом катодного електроосадження. Як біочутливий елемент використовували ФдДГ для ензимного біосенсора, а для клітинного сенсора — клітини генно-інженерного продуцента ФдДГ. Для обох сконструйованих біосенсорів вивчено біоаналітичні характеристики (лінійний діапазон відгуку, чутливість, селективність, стабільність при експлуатації та зберіганні). Проведено тестування ензимного біосенсора для визначення ФА в реальних зразках. Показано, що результати визначення ФА, отримані різними методами, добре корелюють між собою.

Роботу виконано за фінансової підтримки з боку INTAS (проект Open

Call 03-51-6278), Програми НАН України “Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб” та WUBMRC.

Автори вдячні проф. Вольфгангу Шуманну (Wolfgang Shuhman) з Рурського Університету (м. Бохум, ФРН) за допомогу у проведенні експериментів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Солдаткін О.О., Сосовська О.В., Бенілова І.В та ін. Новий кондуктометричний біосенсор для визначення концентрації формальдегіду у модельних зразках // Біопол. і кліт. — 2005. — № 5. — С. 425 – 432.
2. Павлішко Г.М., Гончар Т.М., Гончар М.В. Хімічний та ензиматичний аналіз вмісту формальдегіду у рибних продуктах // Експ. клін. фізіол. біохім. — 2003. — № 4. — С. 56 – 63.
3. Feron V.J., Til H.P., Vrijer F. e. a. Aldehydes: occurrence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment // *Mutat. Res.* — 1991. — Vol. 259. — P. 363 – 385.
4. Yu P.H. Deamination of methylamine and angiopathy; toxicity of formaldehyde, oxidative stress and relevance to protein glycooxidation in diabetes // *J. Neural Transmis.(Suppl.)*. — 1998. — Vol. 52. — P. 201 – 216.
5. Ho M.H., Richards R.A. Enzymatic method for the determination of formaldehyde // *Environ. Sci. Technol.* — 1990. — Vol. 24. — P. 201 – 204.
6. Gonchar M.V., Maidan M.M., Korpan Y.I. e. a. Environmental Biotechnology. Principles and Practice / Eds. M. Moo-Young, W.A. Anderson, A.M. Charkrabarty. Kluwer Acad. Publ. — 1995. — P. 689 – 700.
7. Winter B., Gammann K. Formaldehyde analysis by electrochemical biosensor — FIA // *Fres. Z. Anal. Chem.* — 1989. — Vol. 334. — P. 720.
8. Rindt K.P., Schlittsek S. Biosensor: Application in Medicine, Environmental Protection and Process Control / Eds. R. D. Schmid, F. Scheller. GBF Monographs, Vol. 13. — Weinheim: VCH. 1989. P. 405-415.
9. Сибірний В.А., Гончар М.В., Рябова О.Б. та ін. Современные методы анализа формальдегида, метанола и этанола // *Мікробіол.* — 2005. — Т. 67, № 4. — С. 85 – 110.
10. Демків О.М., Парижак С.Я., Красовська О.С та ін. Конструювання штамів — надпродуцентів формальдегіддегідрогенази метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha* // Біопол. і клітин. — 2005. — Т. 21, № 6. — С. 525 – 530.
11. Demkiv O., Paryzhak S., Gayda G.E. e. a. Formaldehyde dehydrogenase from the recombinant yeast *Hansenula polymorpha*: isolation and bioanalytic application // *FEMS Yeast Res.* — 2007. — № 7. — P. 1153 – 1159.
12. Ngounou B., Neugebauer S., Frodl A. e. a. Combinatorial synthesis of a library of acrylic acid-based polymers and their evaluation as immobilisation matrix for amperometric biosensors // *Electrochim. Acta.* — 2004. — Vol. 49. — P. 3855 – 3863.
13. Puganova E.A., Karyakin A.A. e. a. New materials based on nanostructured Prussian blue for development of hydrogen peroxide sensors // *Sens. Actuat.* — 2005. — Vol. 109, № 1. — P. 167 – 170.
14. Polska Norma PN-71 C-04568. Water and Waste Water. Determination of Methyl Alcohol Content Ed. 5, Polish Com. Standard. eds., Warsaw, 1988

15. *Sawicki E., Hauser T.R., Stanley T.W. e. a.* The 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone test. Sensitive new methods for the detection, rapid estimation, and determination of aliphatic aldehydes // *Anal. Chem.* — 1961. — Vol. 33. — P. 93 – 96.
16. *Avigad G.* Simple spectrometric determination of formaldehyde and other aldehydes: application to periodate oxidized glycerol systems // *Anal. Biochem.* — 1983. — Vol. 134. — P. 499 – 504.
17. *Dijken J.P., Oostra-Demkes G.J., Otto R. e. a.* S-Formylglutathione: the substrate for formate dehydrogenase in methanol-utilizing yeasts // *Arch Microbiol.* — 1976. — Vol. 111. — № 12. — P. 77 – 83.
18. *Schutte H., Flossorf J., Sahm H. e. a.* Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii* // *Eur J. Biochem.* — 1976. — Vol. 62. — P. 151 – 160.
19. *Tanaka N., Kusakabe Y., Ito K. e. a.* Crystal structure of formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: the structural origin of the tightly bound cofactor in nicotinoprotein dehydrogenases // *J. Mol. Biol.* — 2002. — Vol. 324, № 1. — P. 519 – 533.
20. *Fujii Y., Yamasaki Y., Matsemoto M. e. a.* The artificial evolution of an enzyme by random mutagenesis: the development of formaldehyde dehydrogenase // *Biosci. Biotechnol Biochem.* — 2004. — Vol. 68, № 8. — P. 1722 – 1727.

SUMMARY

Olha DEMKIV¹, Bohdan VUS², Mykhailo GONCHAR¹

AMPEROMETRIC BIOSENSORS FOR FORMALDEHYDE MEASUREMENT

¹*Department of Analytical Biotechnology, Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine*

²*National University "Lviv Polytechnic"*

Cell- and enzyme-based biosensors for formaldehyde assay are described. Highly purified formaldehyde dehydrogenase isolated from gene-engineered cells of thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*, and recombinant yeast cells were used, as biorecognition elements. Bioanalytical characteristics of the constructed biosensors were studied. For enzyme-based biosensor, linear detection range for formaldehyde was up to 20 mM, and for cell-based sensor – up to 6 mM. Both sensors revealed high selectivity for formaldehyde with a low cross-sensitivity to other aldehydes. Storage stability for the enzyme-based biosensor was shown to be 15 days, and long-term operational stability of the sensor was estimated as 20 hours. Enzyme-based biosensor was applied for formaldehyde testing in real samples. A good correlation was observed between the biosensor's methods and other standard chemical methods used for this analyte.