

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА НА КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЛЮКОЗООКСИДАЗ ГРИБОВ РОДА *PENICILLIUM*

СЕМАШКО Татьяна Владимировна, к.б.н., *вед. научн. сотр.*

ЖУКОВСКАЯ Людмила Александровна, к.б.н., *научн. сотр.*

ДЕМЕШКО Ольга Дмитриевна, *научн. сотр.*

ЛОБАНОК Анатолий Георгиевич, д.б.н., *профессор, зав. лаб.*

Институт микробиологии НАН Беларуси

Решение медико-социальных задач, обусловленных проблемой сахарного диабета, в значительной степени связано с разработкой современных методов контроля уровня глюкозы в крови – одного из самых распространенных тестов, выполняемых клинико-диагностическими лабораториями. Наиболее перспективные направления развития диагностических и биоаналитических методов исследования основаны на биосенсорных технологиях. Сегодня на мировом рынке биосенсорных систем доля глюкозных анализаторов составляет 85 %. Исследования разработчиков и производителей глюкозных биосенсоров сконцентрированы на улучшении их эксплуатационных характеристик [1, 2].

В настоящее время инновационным направлением в технологиях биосенсоров являются нанотехнологии, позволяющие улучшить характеристики биорецепторных элементов датчиков с помощью новых наноматериалов. Спектр наноматериалов, используемых в сенсорах, достаточно широк. Благодаря своим размерам (1-100 нм), наночастицы обладают уникальными физико-химическими свойствами, которые необходимы для создания нового поколения сенсорных устройств. При разработке биосенсоров на глюкозу широко используются наночастицы металлов, поскольку они обладают хорошими электрокаталитическими свойствами. Это наноструктуры на основе инертных металлов, металлических сплавов, и оксидов металлов. Биосенсоры, сконструированные на основе вышеуказанных наночастиц, характеризуются высокой селективностью, быстрым временем отклика и стабильностью. Наночастицы используют как для модификации трансдьюсера, так и для иммобилизации фермента. Чаще всего при конструировании биосенсоров используют наночастицы золота [3].

Ранее в Институте микробиологии НАН Беларуси с использованием методов индуцированного мутагенеза и генетической инженерии получены продуценты – *Penicillium adametzii* и *P. funiculosum*; определены закономерности биосинтеза ферментов продуцентами; разработаны технологии получения глюкозооксидаз, организовано их производство; продемонстрирована эффективность их использования как компонента амперометрических, кондуктометрических, потенциометрических тест-полосок и биотопливных ячеек; совместно с ОАО «МИНСКИЙ НИИ РАДИОМАТЕРИАЛОВ» разработана и внедрена в производство технология получения индикаторного слоя тест-полосок «Глюкосен» для определения концентрации глюкозы в крови [4].

С 2005 года в Институте микробиологии НАН Беларуси произведено более 100 млн. ед. ферментного препарата Глюкозооксидаза и на его основе в ОАО «МИНСКИЙ НИИ РАДИОМАТЕРИАЛОВ» изготовлено и реализовано большим сахарным диабетом более 4 млн. тест-полосок к экспресс-анализаторам глюкозы в крови больных сахарным диабетом.

В настоящее время сотрудниками Института микробиологии НАН Беларуси и ОАО «МИНСКИЙ НИИ РАДИОМАТЕРИАЛОВ» разрабатываются глюкозные тест-полоски нового поколения, основанные на использовании наноматериалов в составе рецепторного элемента сенсоров для повышения их стабильности, чувствительности, селективности, что обеспечит улучшение качества проводимых анализов.

Цель данного исследования - изучение влияния наночастиц золота и серебра на каталитические свойства глюкозооксидаз грибов рода *Penicillium*.

Для проведения экспериментов были синтезированы наночастицы серебра (6 ± 2 нм) и золота (6 ± 2 нм и 13 ± 3 нм). Препараты глюкозооксидаз *P. adametzii* и *P. funiculosum* были получены методом ультрафильтрации. Отмечено, что, несмотря на более низкие показатели удельной активности (в 1,1-1,7 раза), ферменты грибов рода *Penicillium* по сравнению с коммерческими глюкозооксидазами фирм Roche, Biozyme, Fluka характеризовались более высокой эффективностью связывания глюкозы ($k_{\text{кат}}/K_{\text{м}}=1,1-1,4 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1}\text{с}^{-1}$) (в 1,3-2,1 раза).

Иммобилизацию ферментов на наночастицы осуществляли с использованием глутарового альдегида. Анализ влияния наночастиц на каталитические характеристики ферментов показал, что иммобилизация ферментов на наночастицы практически не влияет ни на скорость окисления глюкозы (V_{max}), ни на эффективность окисления данного субстрата ферментами ($k_{\text{кат}}/K_{\text{м}}$), но уменьшает сродство ферментов к субстрату ($K_{\text{м}}$). По сравнению с показателем нативного фермента $K_{\text{м}}$ глюкозооксидазы *P. funiculosum* ниже в 1,2-1,5 раза, для глюкозооксидазы *P. adametzii* – в 2,5-3,0 раза, для глюкозооксидаз *A. niger* – в 3,4-4,1 раза.

При последующей проверке влияния медиаторов (ферроцена, 1,10-фенантролин-5,6-диола, феназин метилсульфата) на каталитические и спектральные свойства иммобилизованных на наночастицы ферментов установлено, что все медиаторы повышают сродство иммобилизованного фермента к глюкозе ($K_{\text{м}}$) на 2-44 %, эффективность окисления глюкозы ($k_{\text{кат}}/K_{\text{м}}$) при этом увеличивается на 1,15-67,63 %. Максимальное повышение достигнуто при комбинациях глюкозооксидаз грибов рода *Penicillium*, иммобилизованных на наночастицы золота размером 6 ± 2 нм, с 1,10-фенантролин-5,6-дионом и ферроценом ($k_{\text{кат}}/K_{\text{м}}=1,9-2,3 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1}\text{с}^{-1}$).

Согласно данным, полученным при анализе нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих глюкозооксидазы *P. funiculosum* и *P. adametzii*, 1 субъединица каждого из ферментов, содержит большое количество природных флуорофоров (58 аминокислотных остатков), что легко позволяет провести флуоресцентный анализ, и путем измерения поляризации выявить влияние различных соединений на структуру белка. Спектр возбуждения белка изучали в диапазоне 240-300 нм (при λ испускания 330), спектр испускания - 300-400 нм (при λ возбуждения 290).

Спектрофлуориметрически определено, что медиаторы и наночастицы практически не влияют на спектры возбуждения белков. При исследовании спектров испускания композитов, содержащих глюкозооксидазы и наночастицы, наблюдалось уменьшение его интенсивности на 3,2-14,1 %. Дополнение биокомпозитов медиаторами приводило к снижению данного показателя на 18,8-82,8 %. Полученные результаты свидетельствуют о конформационных изменениях в структуре апофермента.

Сравнение операционной стабильности исследуемых композитов, показало, что минимальная стабильность (2 суток) характерна для композитов, включающих глюкозооксидазы *P. adametzii* или *P. funiculosum*, наночастицы серебра и в качестве медиатора феназин метилсульфат. Операционная стабильность 20-27 суток получена для композитов, состоящих из глюкозооксидаз грибов рода *Penicillium*, иммобилизованных на наночастицах золота различного размера, и медиаторов 1,10-фенантролин-5,6-диола или ферроцена.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности конструирования глюкозных сенсоров на основе глюкозооксидаз грибов рода *Penicillium* с использованием наночастиц золота размером 6 ± 2 нм.

Список использованных источников

1. Сахарный диабет [Электронный ресурс] / Сайт Министерства здравоохранения РБ. – 2016. – Режим доступа: http://minzdrav.gov.by/ru/static/for-populetion/new_url_75635544. – Дата доступа: 01.08.2017.

2. Зинов, В.Г. Биосенсерные технологии: мировые драйверы развития направления / В. Г. Зинов, О. В. Черченко // Экономика науки. – 2016. – Т. 2, № 1. – Р. 46-56.

3. Scognamiglio, V. Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years / V. Scognamiglio // Biosensors and Bioelectronics. – 2013. – Vol. 47. – Р. 12-25.

4. Семашко, Т.В. Некоторые аспекты применения глюкозооксидаз *Penicillium adametzii* и *Penicillium funiculosum* / Т. В. Семашко, Р. В. Михайлова // Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов : сб. ст. / Под ред. В.А. Полякова, Л.В. Римаревой. – М.: ВНИИПБТ, 2016. – С. 110-121.