

## Низькотемпературна стабілізація глюкозооксидази в складі біологічного сенсора

В. І. Грищенко, О. А. Нардід, К. Д. Розанова, М. І. Щетинський, Є. Й. Науменко, С. В. Дзядевич<sup>1</sup>

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України  
Вул. Переяславська, 23, Харків, 61015, Україна

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

сгуо@onlin.kharkov.ua

---

*Для пошуку шляхів тривалого зберігання біосенсорів за допомогою низьких температур вивчено вплив заморожування—відігрівання з різними швидкостями охолодження на структурний стан глюкозооксидази. Щоб запобігти втраті властивостей ферменту у процесі низькотемпературного зберігання застосовано такі кріопротектори: гліцерин, 1, 2-пропандіол і ДМСО. Гліцерин і 1, 2-пропандіол виявилися придатнішими для низькотемпературного зберігання глюкозооксидазного сенсора, що дало змогу не лише забезпечити збереження білкової частини біосенсора, а й не порушити захисного шару поверхні біосенсора.*

---

*Ключові слова: глюкозооксидаза, біосенсор, низькі температури, кріопротектори.*

---

Вступ. В останні роки проблема тривалого зберігання біомакромолекул з ферментативною активністю набула поряд із загальнобіологічним і прикладного значення. Частково це пояснюється тим, що ферменти є основним біологічним інструментом біосенсорів, інтенсивне виробництво яких весь час зростає. Ферментні біосенсори у порівнянні з іншими видами сенсорів, наприклад, виготовленими на основі біологічних тканин [1] та клітин [2], мають більшу селективність і чутливість, що найчастіше є визначальними показниками. Та все ж використання ферментів обмежене їхньою порівняно низькою стійкістю за кімнатної температури, тому важливою проблемою для багатьох біосенсорів є необхідність тривалого підтримання їхніх функціональних властивостей упродовж зберігання. Попередньо проведені дослідження дозволили виявити деякі особливості зберігання біосенсорних датчиків за температур, близьких до кімнатної і побутового

холодильника [3, 4], але подальше збільшення термінів зберігання біосенсорів може ґрунтуватися лише на впровадженні технологій низькотемпературного консервування з використанням температур рідкого азоту або наближених до них. Кріоконсервування, у свою чергу, вимагає вивчення впливу процесів заморожування і наступного відігрівання на ферменти, добору умов (складу середовища, швидкостей заморожування і відігрівання) для повноцінного відтворення структурно-функціональних властивостей білків.

У наших дослідженнях використано ферментні біосенсори на основі глюкозооксидази, вперше застосовані кілька десяти років тому [5]. При цьому вони і зараз широко використовуються як у медичній практиці, так і в інших галузях господарства. Однак проблема тривалого зберігання таких біосенсорів не знайшла свого рішення і до сьогодні.

Враховуючи вищезазначене, при виконанні даної роботи перед нами стояла мета: дослідити можливість стабілізації іммобілізованої на поверхні

© В. І. ГРИЩЕНКО, О. А. НАРДІД, К. Д. РОЗАНОВА,  
М. І. ЩЕТИНСЬКИЙ, Є. Й. НАУМЕНКО, С. В. ДЗЯДЕВИЧ,

перетворювача глюкозооксидази у складі біосенсора за допомогою низьких температур. Для цього необхідно було вивчити вплив заморожування—відігрівання і криозахисних речовин на структурно-функціональні параметри глюкозооксидази в розчині та оцінити можливість використання згаданих речовин для збереження структури і ферментативної активності ізольованої глюкозооксидази за низьких температур.

**Матеріали і методи.** У роботі використано глюкозооксидазу ( $\beta$ -D-глюкоза:  $O_2$ -оксидоредуктаза КФ 1.1.3.4) із *Aspergillus niger* фірми «Faizyme» (ПАР), додатково очищену методом гель-хроматографії на колонці з сефадексом G-200. Як криопротектори використовували гліцерин, 1, 2-пропандіол і диметилсульфоксид (ДМСО) марки х. ч. Фермент розчиняли у 0,05 М калій-фосфатному буфері. Конформацію молекули визначали за допомогою спектрів поглинання і їхніх перших похідних в УФ і видимій області, а також спектрів флуоресценції. Активність глюкозооксидази встановлювали при 22 °С за накопиченням перекису водню, який при дії пероксидази утворює з фенолом і 4-амінофеназоном забарвлену сполуку, вимірюючи величину приросту оптичної густини при 540 нм на лінійній ділянці кінетичної кривої [6]. Спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі «Pye Unicam SP 8000» (Велика Британія), спектри флуоресценції — на спектрофлуориметрі «Hitachi F-4010» (Японія).

У більшості випадків заморожування здійснювали із середньою швидкістю 100 град/хв, а для біосенсорів зі швидкістю 3000 град/хв — повільно, із середньою швидкістю 5 град/хв. Відігрівання проводили у водяній бані за температури 22 °С. Ізольований фермент заморожували—відігрівали серіями по шість зразків, одержані результати обробляли загальноприйнятими статистичними методами.

Біосенсори виготовлено і протестовано в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України. Імобілізовану глюкозооксидазу аналізували в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, за кімнатної температури у відкритому об'ємі при інтенсивному перемішуванні.

Для оцінки впливу величини відгуку іммобілізованої глюкозооксидази на введення глюкози залежно від використаних режимів зібрано стандартну установку [7]. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури,

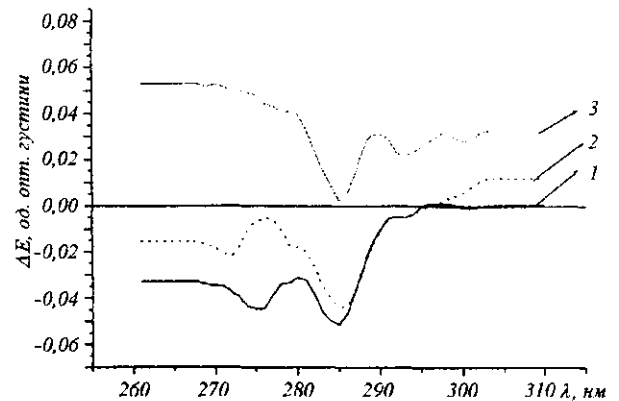


Рис. 1. Диференційні спектри поглинання глюкозооксидази після заморожування—відігрівання: 1 — швидке заморожування; 2 — п'ятиразове швидке заморожування; 3 — повільне заморожування

рН середовища і електричних наведень, виключалися завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірів.

**Результати і обговорення.** Проведеними дослідженнями показано, що після заморожування і наступного відігрівання спостерігаються зміни в структурі спектрів поглинання глюкозооксидази в УФ області. На рис. 1 наведено диференційні спектри поглинання, з аналізу яких випливає, що дія низьких температур призводить до збільшення доступності для розчинника полярних тирозинових залишків, причому ці зміни є вираженішими після швидкого заморожування. При повільному охолодженні відзначено помітні зміни в області поглинання триптофанових залишків, які свідчать про збільшення доступності їх для розчинника, та, ймовірно, часткову агрегацію молекул глюкозооксидази, оскільки зростає помутніння розчину. Таке припущення можна зробити на основі результатів досліджень, якими показано, що агрегація молекул глюкозооксидази відбувається за рахунок гідрофобних взаємодій при розгортанні молекули [8]. Це обумовлено особливостями структури згаданого ферменту: високий вміст триптофану (10 залишків на мономер, сім з яких знаходяться в активному центрі і взаємодіють з флавіном) і високий негативний заряд на поверхні молекули.

Інтенсивність поглинання флавіну також змінюється — вона зменшується усьому діапазоні спектра. Останнє свідчить про те, що заморожування і наступне відігрівання глюкозооксидази викликають зміну конформації поліпептидних ланцюгів глікопротеїду, яка захоплює і область розташування флавінаденінуклєотиду.

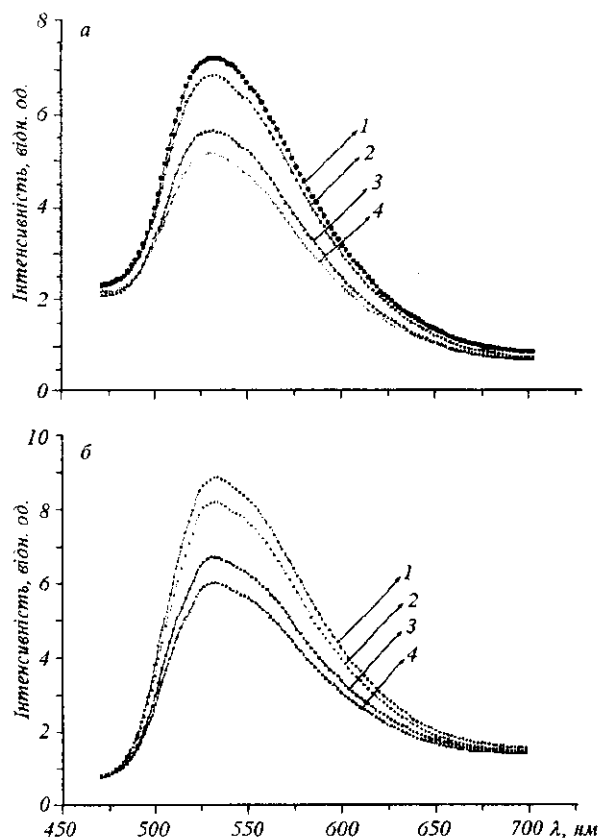


Рис. 2. Спектри флуоресценції глюкозооксидази після заморожування—відігрівання: 1 — контроль; 2 — швидке заморожування; 3 — повільне заморожування; 4 — п'ятиразове швидке заморожування

Спектри флуоресценції триптофану ( $\lambda_{збудж} = 295$  нм) глюкозооксидази мало змінюються після заморожування, з чого випливає, що флавін не відокремлюється від білкової частини молекули [9]. Інтенсивність флуоресценції флавіну ( $\lambda_{збудж} = 370$  і  $450$  нм) значно зменшується після заморожування—відігрівання (рис. 2). Це дозволяє припустити збільшення доступності для розчинника активного центра ферменту як після швидкого, так і повільного охолодження. Таким чином, заморожування—відігрівання призводить до зміни конфомації глюкозооксидази, яка полягає в розпушенні білкової глобули, оскільки спостерігається збільшення доступності хромофорів білка для полярного розчинника. Про це свідчать спектри поглинання і флуоресценції та зміни в оточенні активного центра. Конформаційні перебудови в макромолекулі супроводжуються підвищенням ферментативної активності глюкозооксидази в першу добу після заморожування—відігрівання (табл. 1) і зниженням ак-

Таблиця 1  
Активність глюкозооксидази через 1 год після заморожування—відігрівання

Кріопротектор	Концентрація кріопротектора, %	Активність глюкозооксидази, % до контролю
Без кріопротектора	—	122±5
1, 2-пропандіол	20	96±6
1, 2-пропандіол	60	97±5
Гліцерин	20	112±5
Гліцерин	60	98±4

тивності при подальшому зберіганні за температурі  $4$  °С (рис. 3). Імобілізація ферментів у більшості випадків теж проходить при розпушенні молекул білка [10], тому пошук шляхів захисту функціональної активності глюкозооксидази в цьому разі є характерною проблемою.

В літературі є відомості стосовно того, що для стабілізації глюкозооксидази при заморожуванні—відігріванні підбирали спеціальні буферні розчини, до яких входили переважно цвєтеріони [11]. У той же час показано дуже обмежене застосування електrolітів і поліелектrolітів для стабілізації ферментів у складі біосенсорів, тому що вони можуть впливати на властивості інших складових елементів пристрою [12].

У сучасній кріобіології широко використовують неіоногенні органічні добавки для збереження структурно-функціональних властивостей білків за умов дії на них низьких температур [13, 14]. Тому в нашій роботі для кріозахисту використано вже давно відомий кріопротектор гліцерин, а також 1, 2-пропандіол і ДМСО, які добре зарекомендували себе останнім часом.

Дослідження диференційних спектрів поглинання глюкозооксидази у видимій області в 60 %-х розчинах кріопротекторів виявило, що за присутності гліцерину і 1, 2-пропандіолу вони мають подібну конфігурацію, яка відповідає літературним даним [6] (рис. 4, а). Вища інтенсивність спектрів у розчинах 1, 2-пропандіолу пояснюється більшою проникністю його молекул в область активного центра глюкозооксидази внаслідок меншого розміру молекули. Спектр поглинання в розчині ДМСО значно відрізняється, що може свідчити про значну зміну конфомації глюкозооксидази. Вивчення активності ферменту після експозиції в розчинах кріопротекторів показало, що гліцерин і 1, 2-пропандіол не впливають суттєво на активність глюко-

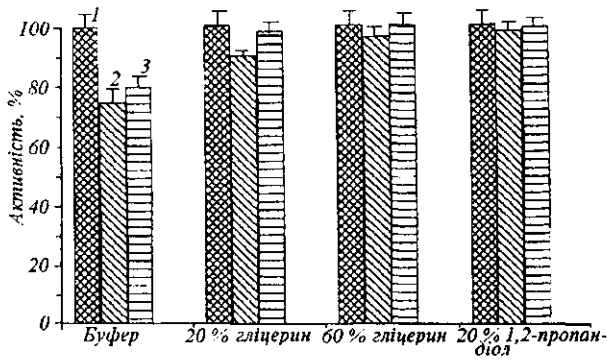


Рис. 3. Активність глюкозооксидази через 24 год після заморожування—відігрівання: 1 — контроль; 2 — швидке заморожування; 3 — повільне заморожування

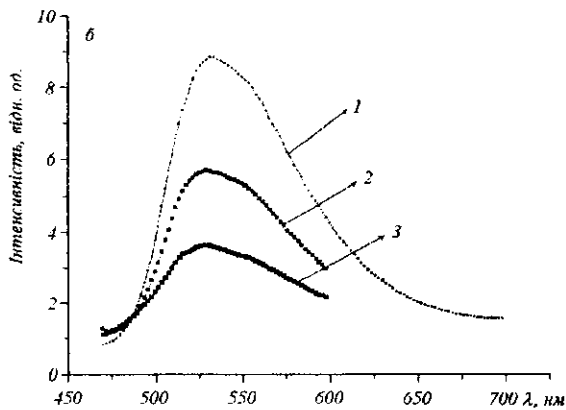
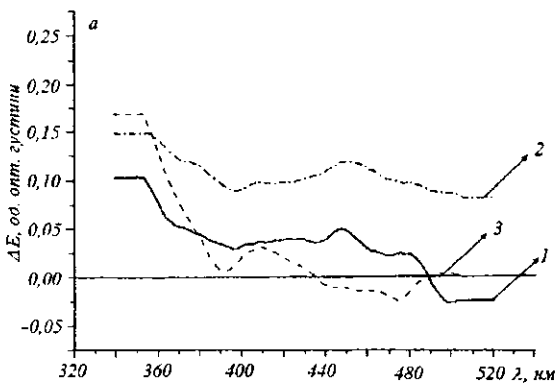


Рис. 4. Диференційні спектри поглинання (а: 1 — гліцерин; 2 — 1, 2-пропандіол; 3 — ДМСО) і спектри флуоресценції (б: 1 — контроль; 2 — 1, 2-пропандіол; 3 — гліцерин) глюкозооксидази в 60 %-х розчинах кріопротекторів

зооксидази, у той час як експозиція в розчині ДМСО призводить до значного її зниження, тому в подальших експериментах цю речовину не застосовували.

Спектри флуоресценції у розчинах гліцерину і 1, 2-пропандіолу ( $\lambda_{\text{будж}} = 450 \text{ нм}$ ) характеризуються меншою інтенсивністю (рис. 4, б) порівняно з

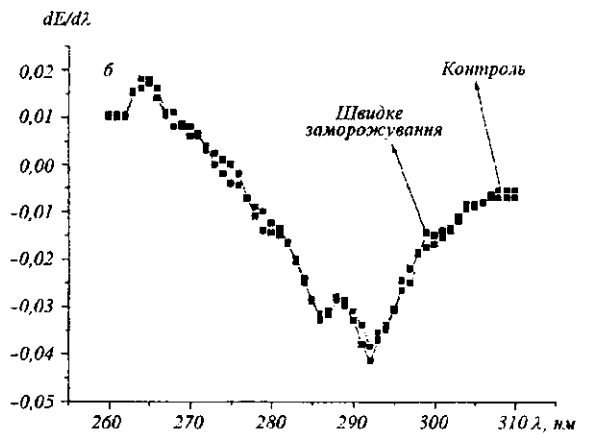
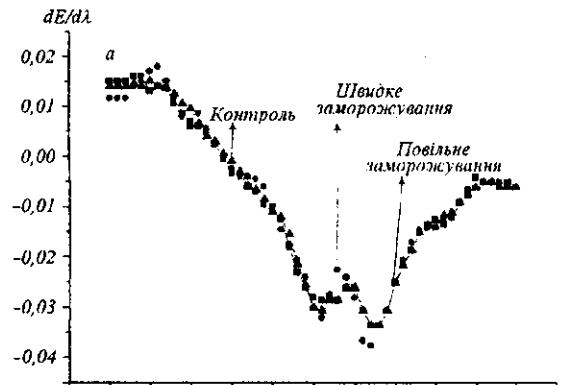


Рис. 5. Перші похідні спектрів поглинання глюкозооксидази після заморожування—відігрівання у 20 %-му (а) і 60 %-му (б) розчинах гліцерину

буферним розчином, причому дія гліцерину помітніша.

Після повільного заморожування білка за присутності 20 %-го гліцерину спектр поглинання в УФ області практично не змінюється (рис. 5). У разі ж швидкого заморожування при цій концентрації гліцерину зберігаються деякі зміни спектра, які спостерігаються при заморожуванні без кріопротекторів у порівнянні з контролем.

При використанні 60 %-го гліцерину вдається, виходячи зі спектрів поглинання, цілком зберегти конформацію білка при всіх досліджених швидкостях заморожування: структура перших похідних заморожених зразків практично повністю збігається з такою контрольних.

Заморожування глюкозооксидази в присутності 20 %-го 1, 2-пропандіолу дозволяє зберегти конформацію ферменту при обох використаних швидкостях охолодження.

Як зазначалося вище, вивчення ферментатив-

Таблиця 2  
Вплив швидкості заморожування, кріопротекторів, та умов зберігання на величину відгуку біосенсорів

Зразок дослідження	Відгук біосенсора, %
1. Контроль	100±3
2. + 60 %-й розчин гліцерину	91±5
3. + 60 %-й розчин 1, 2-пропандіолу	95±5
4. Швидке заморожування без кріопротектора до -196 °C	0
5. Повільне заморожування без кріопротектора до -196 °C	23±4
6. Повільне заморожування з 60 %-м розчином гліцерину до -196 °C	68±7
7. Повільне заморожування з 60 %-м розчином 1, 2-пропандіолу до -196 °C	46±7
8. Зберігання протягом 6 місяців у рідкому азоті з 60 %-м розчином гліцерину після повільного заморожування і відігрівання (1—30 додавань)	63±7
9. Зберігання протягом 6 місяців при 4 °C після перших двох додавань	65±8
10. Зберігання протягом 6 місяців при 4 °C після наступних додавань	0
11. Зберігання протягом 1 року у рідкому азоті з 60 %-м розчином гліцерину після повільного заморожування і відігрівання	65±8
12. Зберігання протягом 1 року при 4 °C	0

ної активності глюкозооксидази в розчинах досліджених кріопротекторів показало (рис. 3), що до заморожування експозиція у розчинах кріопротекторів суттєво не впливає на активність ферменту. Найбільше зниження активності порівняно з контролем відмічено після заморожування глюкозооксидази в 20 %-му розчині гліцерину. Незначно зменшувалася активність після заморожування у 60 %-му розчині гліцерину, мінімальні відхилення (в межах помилки експерименту) відзначено після заморожування в 20 %-му розчині 1, 2-пропандіолу. В усіх досліджених варіантах найбільше зниження активності спостерігалось після швидкого заморожування.

Виникає питання, яким чином такі умови заморожування впливатимуть на біоселективний елемент біосенсорів — глюкозооксидазу в іммобілізованому стані?

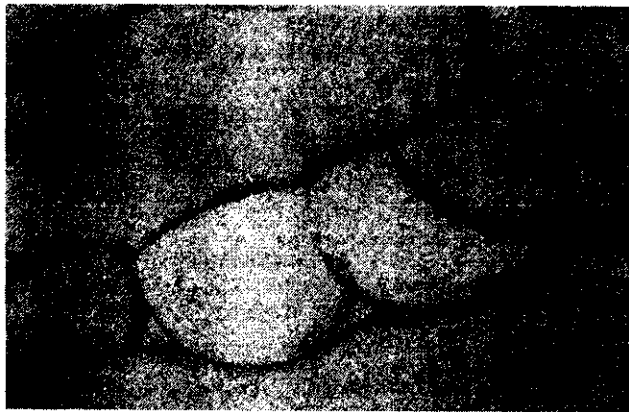
Для експериментів було обрано біосенсори на основі тонкоплівчастих кондуктометричних електродів, виготовлених в Інституті хемо- і біосенсорики (Німеччина), які добре зарекомендували себе на практиці.

Величину відгуку біосенсора з глюкозооксидазою на введення 1 мМ розчину глюкози у калій-фосфатному буфері прийнято за 100 %. Як видно з табл. 2, швидке охолодження без використання кріопротекторів цілком припиняє його роботу. При повільному охолодженні без кріозахисних речовин величина відгуку складала близько 23 %. Для забезпечення захисту біосенсора при заморожуванні і наступному відігріванні використовували 60 %-ві розчини гліцерину і 1, 2-пропандіолу. Застосування високих концентрацій кріопротекторів пояснюється прагненням одержати матрицю, яка піддається склуванню при заморожуванні. Інкубація біосенсорів у розчинах кріопротекторів з наступним триразовим відмиванням буфером протягом 30 хв, як видно з даних табл. 2, незначно погіршує величину відгуку біосенсора.

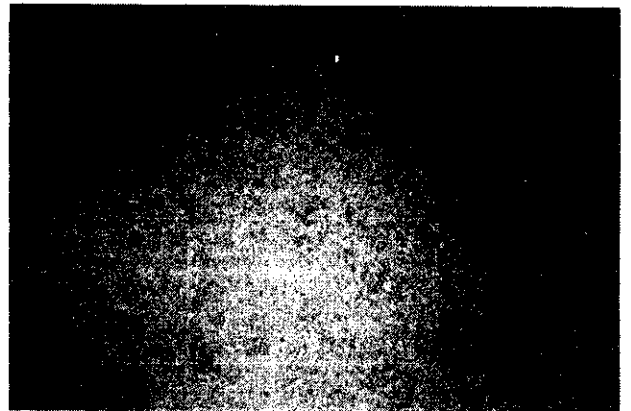
Заморожування біосенсорів у розчинах кріопротекторів покращує їхнє зберігання. Так, у разі використання 60 %-го розчину 1, 2-пропандіолу і повільного охолодження величина відгуку в два рази, а при використанні 60 %-го розчину гліцерину — майже в три рази вища, ніж при заморожуванні без кріопротекторів. Ми вважаємо, що гліцерин є більш прийнятним, оскільки його іноді використовують при виготовленні біосенсорів для поліпшення адгезії глюкозооксидази до поверхні фізичного перетворювача.

Крім того, як випливає з проведених раніше експериментів, гліцерин запобігає руйнуванню захисного шару датчика при заморожуванні (рис. 6). Тому для зберігання досліджених біосенсорів у рідкому азоті обрали повільне охолодження з 60 %-м розчином гліцерину. Експеримент проводили таким чином, що зроблені і протестовані біосенсори після повільного заморожування з 60 %-м розчином гліцерину до -196 °C занурювали у рідкий азот низькотемпературного сховища. Після зберігання протягом 6 місяців і 1 року біосенсори повільно відігрівали на водяній бані при 20 °C та тричі відмивали у 10 мМ фосфатному буфері протягом 30 хв. Далі вимірювали відгуки відповідних біосенсорів на додавання 1 мМ розчину глюкози, що є тестом на біологічну активність глюкозооксидази.

За результатами, наведеними у табл. 2 (рядки 8, 10), величини відгуків збігаються в межах похибки експерименту (63±7 і 65±8 відповідно). Потім біосенсори на основі глюкозооксидази зберігали протягом 6 місяців і 1 року за температури



а



б

Рис. 6. Стан захисного шару трансдюсера після дії на нього швидкого охолодження і відігрівання без попередньої обробки 20 %-м розчином гліцерину (а) та за її наявності (б)

рідкого азоту і при 4 °С для порівняння (табл. 2, рядки 8—12). Як показано в наших дослідженнях, після перших двох додавань 1 мМ розчину глюкози величини відгуків біосенсорів (табл. 2, рядки 8, 9) збігаються в межах похибки експерименту ( $63 \pm 7$  і  $60 \pm 8$  відповідно), але внаслідок наступних додавань (табл. 2, рядок 10) відгук був зовсім відсутній, у той час як біосенсори, що зберігалися за температур рідкого азоту, залишалися в робочому стані навіть після 30 додавань і більше (табл. 2, рядок 8). За таких умов біосенсори, які зберігалися протягом 1 року при температурі 4 °С за прототипом (табл. 2, рядок 12), повністю перестають працювати (відгук відсутній), тоді як величина відгуку біосенсорів, що зберігалися упродовж 1 року за температур рідкого азоту (табл. 2, рядок 11), відповідає величині відгуку біосенсорів, які зберігалися протягом 6 місяців (табл. 2, рядок 8).

Далі для порівняння заморожування з 60 %-ми розчинами гліцерину (табл. 2, рядок 6) і 1, 2-пропандіолу (табл. 2, рядок 7) біосенсори занурювали в окремі пластикові контейнери, після чого повільно (1—5 °С/хв) заморожували до  $-196$  °С. За результатами, наведеними у табл. 2, ефективнішим для подальшого зберігання біосенсорів на основі глюкозооксидази було використання 60 %-го розчину гліцерину.

Таким чином, отримані дані дозволяють зробити наступні висновки:

— заморожування і наступне відігрівання іммобілізованої глюкозооксидази призводять до зміни її конформації, що супроводжується зниженням ферментативної активності, яке є вираженішим при високих швидкостях заморожування;

— присутність у середовищі заморожування гліцерину або 1, 2-пропандіолу дозволяє запобігти змінам, викликаним дією низьких температур;

— визначено оптимальні склад середовища і режими охолодження, за яких не втрачаються властивості іммобілізованої на поверхні перетворювача глюкозооксидази в складі робочого біосенсора при зберіганні його протягом 1 року за температур рідкого азоту з наступним повільним відігріванням.

V. I. Grischenko, O. A. Nardid, K. D. Rozanova, M. I. Schetinsky, E. I. Naumenko, S. V. Dzyadevych

Low-temperature stabilization of glucose oxidase as a component of biological sensor

The effect of freeze-thawing with various cooling rates on structural state of glucose oxidase using low temperatures has been studied for searching the ways of long-term preservation of biosensors. Such cryoprotectors as glycerol, 1,2-propane diol and DMSO were used for complete preservation of the enzyme properties in the process of low temperature preservation. The glycerol and 1,2-propane diol proved to be the most suitable for low temperature preservation of the glucose oxidase sensor that enabled to protect not only the protein part of biosensor but the biosensor protective surface as well.

Key words: glucose oxidase, biosensor, low temperatures, cryoprotectants.

В. И. Грищенко, О. А. Нардид, К. Д. Розанова, М. И. Щетинский, Е. И. Науменко, С. В. Дзядевич

Низкотемпературная стабилизация глюкозооксидазы в составе биологического сенсора

Резюме

Для поиска путей длительного хранения биосенсоров при помощи низких температур изучено влияние замораживания—оттаивания с разными скоростями охлаждения на структурное состояние глюкозооксидазы. Чтобы избежать утраты

свойств фермента в процессе низкотемпературного хранения использованы следующие криопротекторы: глицерин, 1, 2-пропандиол и ДМСО. Глицерин и 1, 2-пропандиол оказались более пригодными для низкотемпературного хранения глюкозооксидазного сенсора, что дало возможность не только уберечь белковую часть биосенсора, но и не нарушить защитного слоя поверхности биосенсора.

Ключевые слова: глюкозооксидаза, биосенсор, низкие температуры, криопротекторы.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Sanders C. A., Rodriguez M., Jr., Greenbaum E. Stand-off tissue based biosensors for the detection of chemical warfare agents using photosynthetic fluorescence induction // *Biosensors and Bioelectronics*.—2001.—16.—P. 439—446.
2. Pancrazio J. J., Whelan J. P., Borkholder D. A., Ma W., Stenger D. A. Development and application of cell-based biosensors // *Ann. Biomed. Eng.*—1999.—27.—P. 697—711.
3. Wolfbeis O. S., Oehme I., Papkovskaya N., Klimant I. Sol-gel based glucose biosensors employing optical oxygen transducers, and a method for compensating for variable oxygen backgrounds // *Biosensors and Bioelectronics*.—2000.—15.—P. 69—76.
4. Ricci F., Moscone D., Tuta C. S., Palleschi G., Amine A., Poscia A., Valgimigli F., Messeri D. Novel planar glucose biosensors for continuous monitoring use // *Biosensors and Bioelectronics*.—2005.—20.—P. 1993—2000.
5. Дзядевич С. В. Амперометрические биосенсоры. Современные технологии и коммерческие варианты анализаторов // *Біополімери і клітина*.—2002.—18, № 5.—С. 363—376.
6. Barham D., Trinder P. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by oxidase system // *Analyst*.—1972.—97.—P. 142—145.
4. Shulga A. A., Soldatkin A. P., Elskaya A. V., Dzyadevich S. V., Patskovsky S. V., Strikha V. I. Thin-film conductometric biosensor for glucose and urea determination // *Biosensors and Bioelectronics*.—1994.—9.—P. 217—223.
5. Gouda M. D., Singh S. A., Rao A.G. A., Thakur M. S., Karanth N. G. Thermal inactivation of glucose oxidase // *J. Biol. Chem.*—2003.—278.—P. 24324—24333.
6. Gidalevitz D., Huang Z., Rice S. A. Protein folding at the air-water interface studied with X-ray reflectivity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1999.—96.—P. 2608—2611.
7. Pat. USA N 949757. Stabilization of enzymes during freezing / S. P. Fitzgerald, J. Campbell, J. K. Lamont, M. A. King // Publ. 2001.
8. Chaniotakis N. A. Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor application // *Anal. Bioanal. Chem.*—2004.—378.—P. 89—95.
9. Розанова Е. Д., Науменко Е. И., Моисеев В. А., Нардид О. А. Структурно-функциональные параметры цитохромоксидазы в растворе и в составе липосом: влияние глицерина // *Пробл. криобиологии*.—1992.—№ 1.—С. 32—35.
10. Тимченко Н. Н., Розанова Е. Д., Кучеренко Ю. В. Спектральные свойства фетального гемоглобина после замораживания—оттаивания в растворах глицерина и 1, 2-пропандиола // *Пробл. криобиологии*.—2001.—№ 4.—С. 73—74.
11. Muller F., Mayhew S. G., Massey V. On the effect of temperature on the absorption spectra of free and protein-bound flavines // *Biochemistry*.—1973.—12.—P. 4654—4662.

УДК 577.152.1:57.043  
Надійшла до редакції 06.07.05