

РАЗРАБОТКА БИОСЕНСОРА НА ОСНОВЕ ФИЦИНА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ЛИПАЗЫ

М.Г. Холявка^{1,2}, В.А. Королева³, А.С. Бородина⁴, Н.А. Балбеков¹, В.Г. Артюхов¹

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

²ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»

³ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко»

⁴ФГБУН Институт биологии внутренних вод им. И.Д. Папанина РАН

Поступила в редакцию 14.02.2024 г.

Аннотация. Достижения инженерной энзимологии легли в основу современных безреагентных методов анализа с использованием различных биохимических сенсоров. Присутствие биоматериала с уникальными свойствами позволяет с высокой точностью определять необходимые соединения в сложных смесях без необходимости применения дополнительных реагентов или манипуляций.

Высокий уровень специфичности катализируемых реакций делает ферменты идеальными сенсорами для аналитических целей. Биосенсоры способны обнаруживать вещества в предельно низких концентрациях, а также при наличии в растворе множества других соединений. На сегодняшний день существуют различные искусственные аналитические системы с иммобилизованными ферментами и клетками, предназначенные для автоматического обнаружения продуктов ферментативных реакций.

Процедура иммобилизации фермента играет ключевую роль в создании стабильного распознающего элемента биосенсора, обуславливая его операционные характеристики, чувствительность и способность точно определять изменение концентрации биологических компонентов в сложных смесях. Выбор типа датчика для электрода должен соответствовать характеру ферментативной реакции. Датчик должен реагировать на один из продуктов или субстратов ферментативной реакции. Важно помнить, что чем прочнее иммобилизован фермент, тем стабильнее он будет и тем дольше его можно использовать для проведения измерений. Биосенсоры функционально схожи с биорецепторами, способными преобразовывать различные типы сигналов из окружающей среды в электрические сигналы.

Фицин (КФ 3.4.22.3) – цистеиновая протеаза. Липаза (КФ 3.1.1.3) – фермент, катализирующий расщепление триглицеридов на глицерин и высшие жирные кислоты. Определение содержания липазы позволяет диагностировать широкий спектр заболеваний, в частности, панкреатит, перитонит, рак молочной железы.

В нашей лаборатории был разработан биосенсор на основе фицина, иммобилизованного на печатных электродах. Отчетливый пик на вольтаммограмме в диапазоне от 500 до 700 мВ при добавлении к датчику раствора липазы свидетельствовал о протекании процессов гидролиза липазы фицином.

Показано, что печатные электроды, модифицированные фицином, перспективны для детектирования пищеварительного фермента липазы для обнаружения заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Ключевые слова: биосенсор, фицин, липаза

Уникальная специфичность ферментов играет ключевую роль в их применении для аналитических целей. Ферментные методы анализа отличаются высокой точностью, чувствительностью и

быстрым откликом на сигнал, что делает их идеальным выбором для работы в сложных средах [1]. Разнообразие ферментов, включая оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы и др., используется в аналитической энзимологии, где помимо моноферментных систем активно применяются мультиферментные. Ферментный анализ относит-

ся к кинетическим методам анализа, при котором искомое соединение определяют по скорости реакции, пропорциональной концентрации тестируемого вещества [2].

Бурное развитие инженерной энзимологии способствовало разработке безреагентных методов анализа с использованием биохимических сенсоров. Уникальные свойства биоматериалов в устройствах обеспечивают высокую селективность при определении нужных соединений в сложных смесях без необходимости дополнительных операций с реагентами [3].

Одним из критических факторов в создании надежных биосенсоров является процесс иммобилизации каталитически активного компонента, который определяет работоспособность сенсора, его чувствительность и способность селективно определять отдельные компоненты в сложных смесях. При разработке ферментных электродов критическое значение имеют характеристики чистоты фермента, чтобы минимизировать вклад побочных реакций. Кроме того, важен уровень активности фермента и соответствие типа датчика природе реакции [4]. Корректно подобранная методика иммобилизации фермента обеспечивает стабильность и долговечность биосенсора, а также возможность проведения большего числа измерений [5-7].

Ферменты благодаря своей высокой эффективности и специфичности становятся основой для создания идеальных сенсоров для аналитической химии. Они позволяют обнаруживать вещества в низких концентрациях в присутствии других соединений. Существуют различные искусственные аналитические системы, такие как биосенсоры, датчики, ферментные электроды, способные автоматически обнаруживать продукты энзиматического превращения [8].

Биосенсоры позволяют быстро и с высокой степенью точности определять содержание множества соединений, таких как глюкоза, аминокислоты, антибиотики в многокомпонентных средах, поэтому их широко применяют в медицине, промышленности и научных исследованиях для анализа биологических жидкостей, а именно, для диагностики заболеваний, контроля содержания вредных веществ в пищевых продуктах и в воздухе. Биосенсоры на базе иммобилизованных ферментов подобны биорецепторам, способным преобразовывать различные типы сигналов в электрические [9-12].

Фицин (КФ 3.4.22.3) – цистеиновая протеаза, которая продуцируется тропическими растени-

ями рода *Ficus*. Фермент сохраняет активность в широком диапазоне значений pH (6,5-9,5). Изoeлектрическая точка энзима равна 9,0. Температурный оптимум фицина находится в пределах 60-65 °C, инактивируется фермент при 80 °C [13].

Липаза (КФ 3.1.1.3) – фермент, катализирующий расщепление триглицеридов на глицерин и высшие жирные кислоты. В норме у человека активность липазы составляет от 0 до 190 МЕ/л. В организме человека липазу вырабатывают многие органы, поэтому выделяют липазу желудочного происхождения, поджелудочной железы, легких, кишечного сока, лейкоцитов и др. Наибольшее внимание привлекает панкреатическая липаза, так как она выполняет важнейшую функцию – переваривание жиров. Определение содержания липазы позволяет диагностировать широкий спектр заболеваний, в частности, панкреатит, перитонит, рак молочной железы, COVID-19 [14-20].

Целью работы являлась разработка биосенсора на основе фицина для детектирования липазы в растворе.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Объектом исследования был выбран фицин фирмы «Sigma», субстратом для гидролиза служила липаза фирмы «Sigma». Основу для создания биосенсора составляли печатные электроды производства ООО «Русенс», которые представляют собой планарные электроды, производимые методом трафаретной печати. Рабочий и вспомогательный электроды изготавливаются из углеродной пасты, электрод сравнения – из серебряной. Размеры: 10×28×0,35 мм. Сопротивление: 10-30 Ом. Материал подложки – полиэтилентерефталат (ПЭТФ).

Модификация печатных электродов. 10 мкл раствора фицина (концентрация 10 мг/мл, 0,05 М глициновый буфер, pH 9,0) наносили на рабочий электрод, оставляли до полного высыхания при комнатной температуре.

Получение вольтаммограммы методом циклической вольтамперометрии.

100 мкл раствора липазы (концентрация 3 мг/мл, 0,05 М трис-HCl буфер, pH 7,5) наносили на модифицированный фицином печатный электрод, полностью покрывая рабочий, вспомогательный и электрод сравнения. Далее измеряли вольтамперные характеристики сенсора с помощью потенциостата IPC-ProMF. Использовался треугольный входной сигнал, время дискретизации составляло

10 мкс, подаваемое напряжение изменялось от -1 до +1 В. Измерение сигнала производилось в течение 40 секунд при комнатной температуре.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электроаналитическое поведение ферментного печатного электрода на основе фицина по отношению к липазе изучалось методом циклической вольтамперометрии (рис. 1). В качестве контрольных экспериментов были записаны отдельные вольтаммограммы 0,05 М трис-НСl буфера с pH 7,5, раствора липазы в концентрации 3 мг/мл в 0,05 М трис-НСl буфере с pH 7,5, раствора фицина в концентрации 10 мг/мл в 0,05 М глициновом буфере с pH 9,0.

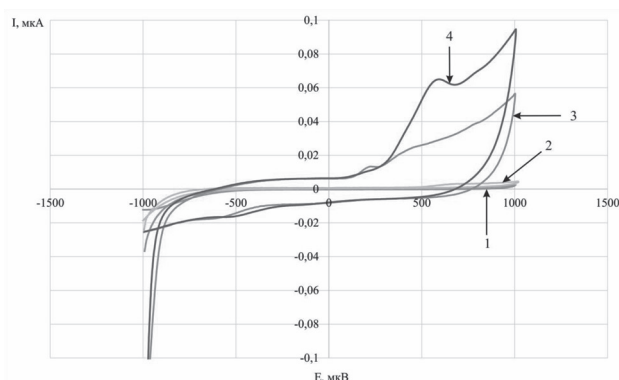


Рис. 1. Циклические вольтаммограммы, полученные при нанесении на печатный электрод: 1 – 0,05 М трис-НСl буфера, pH 7,5; 2 – раствора липазы в концентрации 3 мг/мл в 0,05 М трис-НСl буфере, pH 7,5; 3 – раствора фицина в концентрации 10 мг/мл в 0,05 М глициновом буфере, pH 9,0, а также 4 – при нанесении на модифицированный фицином печатный электрод раствора липазы

Наблюдался отчетливый пик на вольтаммограмме в диапазоне от 500 до 700 мкВ при добавлении к датчику раствора липазы, что свидетельствует о протекании процессов гидролиза липазы фицином. Постепенное увеличение силы тока на отдельной вольтаммограмме раствора фицина в концентрации в 0,05 М глициновом буфере с pH 9,0 без образования пика в области 500-700 мкВ говорит о возможном протекании процессов автолиза. Сенсор детектировал липазу в количестве 0,3 мг. Дальнейшие исследования будут направлены на снижение порога чувствительности сенсора к концентрации липазы.

Таким образом, можно сделать заключение о том, что печатные электроды, модифицированные

фицином, весьма перспективны для детектирования пищеварительных ферментов-маркеров, в частности липазы, для обнаружения заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Коллектив авторов выражает благодарность инженеру-химику ООО «Эко-Центр» Шевцовой Надежде Евгеньевне за помощь в проведении эксперимента.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Холявка М. Г. Практикум по биотехнологии: иммобилизованные биологические объекты в системе лабораторных работ / М. Г. Холявка, М. А. Наквасина, В. Г. Артюхов. Воронежский государственный университет. – Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017. – 161 с.
2. Кулис Ю. Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов / Ю. Ю. Кулис– Вильнюс: Изд-во Мокслас, 1981. – 200 с.
3. Холявка М. Г. Иммобилизованные биологические системы: биофизические аспекты и практическое применение: учебное пособие / М. Г. Холявка, В. Г. Артюхов. Воронежский государственный университет. – Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2017. – 261 с.
4. Иммобилизованные ферменты / под ред. И. В. Березина – М.: Высшая школа, 1987. – 160 с.
5. Артюхов В. Г. Структурно-функциональные свойства инулиназ. Пути регулирования их активности / В. Г. Артюхов, М. Г. Холявка, Т. А. Ковалёва. – Биофизика. – 2013. – Т. 58. – № 4. – С. 635-644.
6. Kholyavka M. G. Efficient fructose production from plant extracts by immobilized inulinases from *Kluyveromyces marxianus* and *Helianthus tuberosus* / M. G. Kholyavka, A. R. Kayumov, D. R. Baydamshina, V. A. Koroleva, E. Yu. Trizna, M. V. Trushin // International Journal of Biological Macromolecules. – 2018. – Vol. 115. – P. 829-834.
7. Ковалева Т. А. Исследование иммобилизации инулиназы на ионогенных и неионогенных носителях / Т. А. Ковалева, М. Г. Холявка, А. С. Таха // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2007. – Т. 7. – № 5. – С. 804-810.
8. Будников Г. К. Биосенсоры как новый тип аналитический устройств / Г. К. Будников // Соросовский образовательный журнал. – 1996. – №12. – С. 26-32.

9. Варфоломеев С. Д. Биосенсоры / С. Д. Варфоломеев // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 1. – С.45-49.
10. Clark L. C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. / L. C. Clark, C. Lyons // Annals of the New York Academy of Sciences. – 1962. – Vol. 102. – No. 1. – P. 29.
11. Turner A. P. Biosensors: sense and sensibility / A. P. Turner // Chem Soc Rev. – 2013. – No. 8. – P. 3184 – 3195.
12. Lowe C. R. Biosensors / C. R. Lowe // Trends in Biotechnology. – 1984. – Vol. 2. – No. 3. – P. 59–65.
13. Holyavka M. Novel biotechnological formulations of cysteine proteases, immobilized on chitosan. Structure, stability and activity / M. Holyavka, V. Koroleva, S. Olshannikova, V. Artyukhov, D. Faizullin, N. Zakhartchenko, Y. Zuev, M. Kondratyev, E. Zakharova // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol. 180. – P. 161-176.
14. Попова Т.Н. Медицинская энзимология : учеб. пособие / Т.Н. Попова, Т.И. Рахманова, С.С. Попов. – Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2017. – С. 42-43.
15. Ismail A. R. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects / A. R. Ismail, K.-H. Baek // International Journal of Biological Macromolecules. –2020. – Vol. 163. – P. 1624-1639.
16. Chandra P. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review / P. Chandra, Enespa, R. Singh, P. K. Arora // Microbial Cell Factories. – 2020. – Vol. 19. – P. 169.
17. Almeida F. L. C. Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis / F. L. C. Almeida, M. P. J. Castro, B. M. Travalia, M. B. S. Forte // Process Biochemistry. – 2021. – Vol. 110. – P. 37-51.
18. Rafiee F. Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications / F. Rafiee, M. Rezaee // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol. 179. – P. 170-195.
19. Barlass U. Marked Elevation of Lipase in COVID-19 Disease: A Cohort Study / U. Barlass, B. Williams, K. Dhana, D. Adnan, S. R. Khan, M. Mahdavinia, F. Bishehsari // Clinical and Translational Gastroenterology. –2020. – Vol. 11. – No. 7. – P. e00215.
20. Li M.-M. Structure-activity relationship of dietary flavonoids on pancreatic lipase / M.-M. Li, Y.-T. Chen, J.-C. Ruan, W.-J. Wang, J.-G. Chen, Q.-F. Zhang // Current Research in Food Science. – 2023. – Vol.6. – P. 100424.

Воронежский государственный университет

**Холявка Марина Геннадьевна, д.б.н., профессор медико-биологического факультета кафедры биофизики и биотехнологии, профессор кафедры «Физика», ФГАОУ ВО Севастопольский государственный университет*

E-mail: holyavka@rambler.ru

Балбеков Никита Александрович, студент кафедры физической химии

E-mail: balbekov.nikita@yandex.ru

Артюхов Валерий Григорьевич, д.б.н., проф., заведующий кафедрой биофизики и биотехнологии медико-биологического факультета

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко

Королева Виктория Александровна, ассистент кафедры биологии

E-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Voronezh State University

Holyavka Marina G. – DSci., Professor of Biophysics and biotechnology department, Professor of the Department of Physics, Sevastopol State University

E-mail: holyavka@rambler.ru

Balbekov Nikita A., student of Department of Physical Chemistry

E-mail: balbekov.nikita@yandex.ru

Artyukhov Valery G., DSci., Full Professor, Head of Biophysics and biotechnology department

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

Koroleva V. A., assistant of Department of Biology

E-mail: koroleva_victoria@bk.ru

Институт биологии внутренних вод им. И.Д.
Папанина Российской академии наук
Бородин Анастасия Сергеевна – младший на-
учный сотрудник лаборатории микробиологии
E-mail: asborodina@ibiw.ru

Papanin Institute for Biology of Inland Waters
Russian Academy of Sciences
Borodina A. S., junior researcher of the
microbiology laboratory
E-mail: asborodina@ibiw.ru

DEVELOPMENT OF A BIOSENSOR BASED ON FICIN FOR DETERMINING LIPASE

M.G. Holyavka^{1,2}, V.A. Koroleva³, A.S. Borodina⁴, N.A. Balbekov¹, V.G. Artyukhov¹

¹Voronezh State University

²Sevastopol State University

³Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko

⁴Papanin Institute for Biology of Inland Waters Russian Academy of Sciences

Abstract. Achievements in engineering enzymology formed the basis for modern reagent-free analysis methods using various biochemical sensors. The presence of a biomaterial with unique properties makes it possible to accurately determine the required compounds in complex mixtures without the need for additional reagents or manipulations.

The high level of specificity of the catalyzed reactions makes enzymes ideal sensors for analytical purposes. Biosensors are capable of detecting substances in extremely low concentrations, as well as in the presence of many other compounds in solution. Today, there are various artificial analytical systems with immobilized enzymes and cells designed for the automatic detection of products of enzymatic reactions.

The enzyme immobilization procedure plays a key role in creating a stable recognition element of the biosensor, determining its operational characteristics, sensitivity and ability to accurately determine changes in the concentration of biological components in complex mixtures. The choice of sensor type for the electrode should correspond to the nature of the enzymatic reaction. The sensor must respond to one of the products or substrates of the enzymatic reaction. It is important to remember that the more firmly an enzyme is immobilized, the more stable it will be and the longer it can be used for measurements. Biosensors are functionally similar to bioreceptors, capable of converting various types of signals from the environment into electrical signals.

Ficin (EC 3.4.22.3) is a cysteine protease. Lipase (EC 3.1.1.3) is an enzyme that catalyzes the breakdown of glycerides into glycerol and higher fatty acids. Determination of lipase content makes it possible to diagnose a wide range of diseases, in particular pancreatitis, peritonitis, and breast cancer.

Our laboratory has developed a biosensor based on ficin immobilized on printed electrodes. A distinct peak in the voltammogram in the range from 500 to 700 μ V when a lipase solution was added to the sensor indicated the occurrence of lipase hydrolysis processes with ficin.

Ficin-modified printed electrodes have been shown to be promising for detecting the digestive enzyme lipase for the detection of gastrointestinal diseases.

Keywords: biosensor, ficin, lipase

REFERENCES

1. Holyavka M.G. Praktikum po biotekhnologii: immobilizovannyye biologicheskie ob"ekty v sisteme laboratornyh rabot / M. G. Holyavka, M. A. Nakvasina, V.G. Artyukhov. Voronezhskij gosudarstvennyj universitet. – Voronezh: Izdatel'skij dom VGU, 2017. – 161 s.
2. Kulis Yu.Yu. Analiticheskie sistemy na osnove immobilizovannyh fermentov / Kulis Yu.Yu. – Vil'nyus: Izd-vo Mokslas, 1981. – 200 s.
3. Holyavka M.G. Immobilizovannyye biologicheskie sistemy: biofizicheskie aspekty i prakticheskoe primenenie: uchebnoe posobie / M.G. Holyavka, V.G. Artyukhov. Voronezhskij gosudarstvennyj universitet. – Voronezh: Izdatel'skij dom VGU, 2017. – 261 s.
4. Immobilizovannyye fermenty / pod red. I.V. Berezina – M.: Vysshaya shkola, 1987. – 160 s.
5. Artyukhov V. G. Structural and functional properties of inulinases. Ways to regulate their

- activity / V. G. Artyukhov, M. G. Holyavka, T. A. Kovaleva // *Biophysics*. – 2013. – Vol. 58. – No 4. – P. 493-501.
6. Kholiyavka M. G. Efficient fructose production from plant extracts by immobilized inulinases from *Kluyveromyces marxianus* and *Helianthus tuberosus* / M. G. Kholiyavka, A. R. Kayumov, D. R. Baydamshina, V. A. Koroleva, E. Yu. Trizna, M. V. Trushin // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2018. – Vol. 115. – P. 829-834.
7. Kovaleva T. A. Study of inulinase immobilization on ionic and nonionic carriers / T. A. Kovaleva, M. G. Holyavka, A. S. Taha // *Sorbitsionnye i Khromatograficheskie Protsessy*. – 2007. – Vol. 7. – No. 5. – P. 804-810.
8. Budnikov G. K. Biosensors as a new type of analytical devices / G. K. Budnikov // *Soros Educational Journal*. – 1996. – No. 12. – P. 26-32.
9. Varfolomeev S. D. Biosensors / S. D. Varfolomeev // *Soros Educational Journal*. – 1997. – No. 1. – P.45-49.
10. Clark L. C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. / L. C. Clark, C. Lyons // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1962. – Vol. 102. – No. 1. – P. 29.
11. Turner A. P. Biosensors: sense and sensibility / A. P. Turner // *Chem Soc Rev*. – 2013. – No. 8. – P. 3184 – 3195.
12. Lowe C. R. Biosensors / C. R. Lowe // *Trends in Biotechnology*. – 1984. – Vol. 2. – No. 3. – P. 59–65.
13. Holyavka M. Novel biotechnological formulations of cysteine proteases, immobilized on chitosan. Structure, stability and activity / M. Holyavka, V. Koroleva, S. Olshannikova, V. Artyukhov, D. Faizullin, N. Zakhartchenko, Y. Zuev, M. Kondratyev, E. Zakharova // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 180. – P. 161-176.
14. Popova T. N. *Medicinskaya enzimologiya : ucheb. posobie* / T. N. Popova, T. I. Rahmanova, S. S. Popov. – Voronezh: Izdatel'sko-poligraficheskij centr Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta, 2017. – S. 42-43.
15. Ismail A. R. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects / A. R. Ismail, K.-H. Baek // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Vol. 163. – P. 1624-1639.
16. Chandra P. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review / P. Chandra, Enespa, R. Singh, P. K. Arora // *Microbial Cell Factories*. – 2020. – Vol. 19. – P. 169.
17. Almeida F. L. C. Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis / F. L. C. Almeida, M. P. J. Castro, B. M. Travalia, M. B. S. Forte // *Process Biochemistry*. – 2021. – Vol. 110. – P. 37-51.
18. Rafiee F. Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications / F. Rafiee, M. Rezaee // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2021. – Vol. 179. – P. 170-195.
19. Barlass U. Marked Elevation of Lipase in COVID-19 Disease: A Cohort Study / U. Barlass, B. Williams, K. Dhana, D. Adnan, S. R. Khan, M. Mahdavinia, F. Bishehsari // *Clinical and Translational Gastroenterology*. – 2020. – Vol. 11. – № 7. – P. e00215.
20. Li M.-M. Structure-activity relationship of dietary flavonoids on pancreatic lipase / M.-M. Li, Y.-T. Chen, J.-C. Ruan, W.-J. Wang, J.-G. Chen, Q.-F. Zhang // *Current Research in Food Science*. – 2023. – Vol.6. – P. 100424.