

АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫЕ БИОСЕНСОРЫ: РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЕ (КРАТКИЙ ОБЗОР)

© 2019 г. С.Ж. Ибадуллаева*, Н.О. Аппазов*, Ю.С. Тараховский**, Е.А. Замятина**,
М.Г. Фомкина**, Ю.А. Ким***

*Кызылординский государственный университет им. Коркыт Ата,
120008, Кызылорда, ул. Айтеке Би, 29А, Казахстан

**Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

***Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: yuk01@rambler.ru

Поступила в редакцию 23.07.2019 г.

После доработки 23.07.2019 г.

Принята к публикации 02.08.2019 г.

В последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в разработке ферментных биосенсоров, которые находят применение в фармакологии, клинической практике, в сельском хозяйстве, в контроле качества пищевых продуктов, мониторинге возбудителей инфекционных заболеваний и распространении факторов загрязнения окружающей среды. Функционирование амперометрических мультиферментных биосенсоров основано на природных механизмах распознавания. Для повышения эффективности конструкции биосенсора должна позволять анализируемым веществам беспрепятственно взаимодействовать с ферментами, участвующими в каталитических реакциях, что требует знаний как о свойствах исследуемой среды, так и о свойствах самих анализируемых веществ. Для выявления, распознавания и оценки концентрации веществ в среде требуется также учитывать факторы, способные подавлять или искажать сигнал, что может быть связано с взаимодействием компонентов биосенсора друг с другом и с молекулами исследуемой среды. Указанные факторы могут меняться не только в процессе хранения или после многократного использования биосенсора, но также в течение единичного измерения. В процессе развития измерительной техники были достигнуты значительные успехи в совершенствовании конструкции биосенсоров. В обзоре рассматривается развитие наиболее интересных и перспективных тенденций в развитии амперометрических мультиферментных биосенсоров, наметившихся в последние годы.

Ключевые слова: биосенсор, мультиферментные комплексы, каскадная реакция, метаболиты.

DOI: 10.1134/S0006302919050065

Мультиферментные биосенсоры – это разновидность ферментных биосенсоров, в которых система распознавания состоит из двух и более ферментов, использующих каскады ферментативных реакций [1–6]. Их появление было вызвано потребностью увеличить чувствительность, селективность и диапазон анализируемых веществ. В некоторых случаях биосенсоры, основанные на одном ферменте, не могут быть применены для обнаружения анализируемого соединения. Поэтому исследователи используют в биосенсорах системы, состоящие из нескольких

ферментов, которые обеспечивают прохождение мультиферментных каскадных реакций. По ряду показателей использование мультиферментных каскадных реакций в биосенсорах обладает значительным преимуществом над биосенсорами, содержащими только один фермент [7]. Мультиферментные биосенсоры находят широкое практическое применение в фармакологии и клинической диагностике [5,6,8,9], анализе пищевых продуктов [10–14], мониторинге окружающей среды [15,16]. Разработаны электрохимические биосенсоры для количественной оценки концентрации биохимических метаболитов [7]. Ранняя диагностика заболеваний, например, болезней Паркинсона и Альцгеймера, диабета и различных типов рака, а также мониторинг реакции пациентов на терапию играют решающую роль в лечении

Сокращения: НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид, НАДН – восстановленная форма никотинамидадениндинуклеотида, Хол.Окс. – холестериноксидаза, Хол.Эст. – холестеринэстераза, PtNP – наночастицы платины, ИТО – оксид индия и олова, ПРХ – пероксидаза хрена.

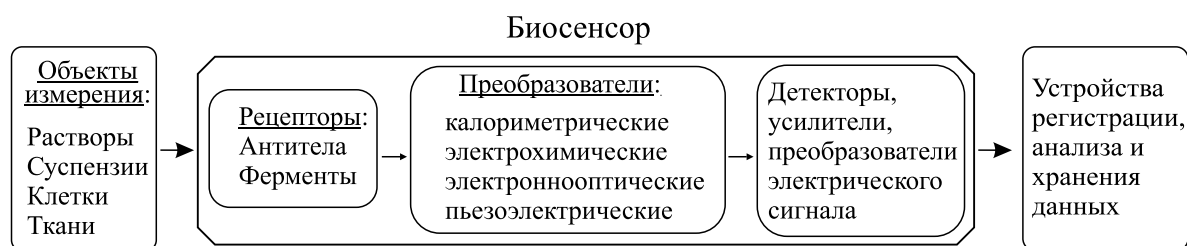


Рис. 1. Основные принципы устройства биосенсоров. Заимствовано с изменениями из работы [26].

болезней. В пищевой промышленности анализ питательных веществ в продуктах имеет важное значение для контроля качества. Глюкан, L-лактат [17], полифенол [18] и сульфиты [19] являются типичными целевыми аналитами для мультиферментных биосенсоров в анализе пищевых продуктов.

Биосенсоры, в которых используются углеродные наноматериалы, стали важными инструментами в распознавании биомаркеров, в которых электродный материал и архитектура играют решающую роль. Благодаря превосходным механическим, электронным и оптическим свойствам углеродные наноматериалы в форме листов, частиц или точек, трубок или проволок в последнее время стали незаменимыми элементами биосенсорных платформ [20–25]. В представленном кратком обзоре обсуждаются основные принципы разработки биосенсоров на основе каскадных мультиферментных реакций и их применение на практике.

ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ БИОСЕНСОРОВ

В основе устройства биосенсоров лежит естественная способность антител и ферментов распознавать различные молекулы, растворенные в окружающей среде или в жидкостях внутри животных и растений, включая клетки и ткани. При создании биосенсоров используются детекторы, позволяющие преобразовывать сигнал распознавания в физические или химические процессы, которые могут быть зарегистрированы специализированными детекторами, предназначенными для преобразования регистрируемых изменений в электрический ток (рис. 1).

При выделении тепла используются калориметрические детекторы в калориметрических биосенсорах [27], при перемещении зарядов – электрохимические детекторы в электрохимических биосенсорах [28], при выделении квантов света – электроннооптические детекторы в оптических биосенсорах [29], а при возникновении механических воздействий – пьезоэлектрические детекторы в пьезоэлектрических биосенсорах [30]. Полученные электрические сигналы усили-

ваются, после чего они подлежат анализу, визуализации и хранению.

АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ

Биосенсоры, работа которых основана на использовании электрохимических реакций, влияющих на величину электрического тока в системе, называются амперометрическими. В последние годы ведутся обширные исследования в этой области. Создано большое разнообразие биосенсоров, которые условно можно разделить как минимум на три поколения в соответствии со способом переноса электронов, используемых в их конструкции.

В первом поколении амперометрических биосенсоров фермент иммобилизован на поверхности преобразователя, который способен обнаружить превращение субстрата в электроактивный продукт в результате чего образуется перекись водорода (рис. 2). В процессе окислительно-восстановительной реакции электроны переносятся к кислороду, в результате чего изменяется концентрация перекиси водорода, что можно обнаружить по величине электрического тока. Благодаря этому осуществляется измерение концентрации анализируемых соединений [7,31,32].

Обычно используются два основных класса ферментов – оксидазы и дегидрогеназы. У этих ферментов в качестве кофермента используются никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺) или никотинамиддинуклеотидфосфат, аденозинтрифосфат, флавинадениндинуклеотид, а также его восстановленная форма, которые подвергаются циклическим процессам окисления–восстановления, необходимым для обеспечения процессов измерения.

В биосенсорах первого поколения, основанных на использовании оксидаз, наиболее распространенным кофактором является флавинадениндинуклеотид. Эти биосенсоры могут отслеживать продуцирование перекиси водорода, используя потенциал на аноде +0,7 В против хлорсеребряного электрода (Ag/AgCl), или потребление кислорода, используя потенциал на катоде –0,7 В против Ag/AgCl. Эти биосенсоры

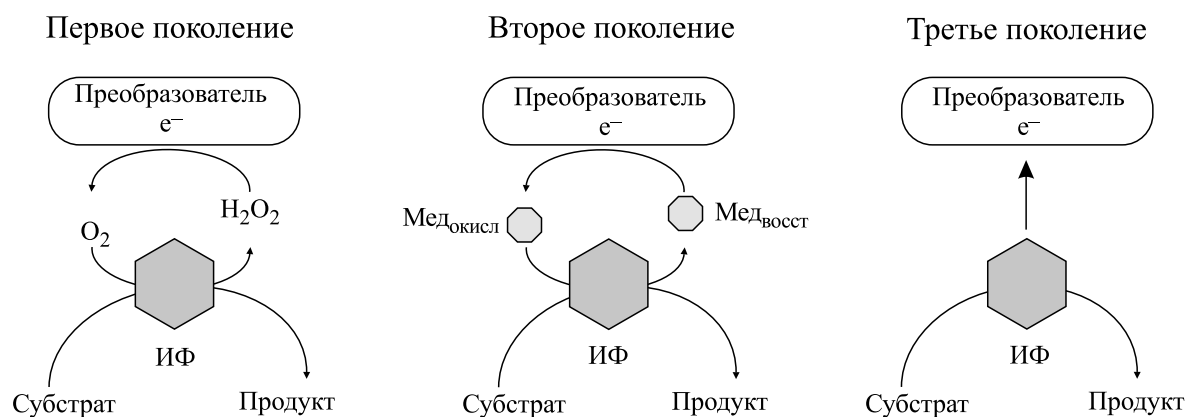


Рис. 2. Схематическое изображение трех поколений амперометрических ферментных биосенсоров, преобразующих сигнал от иммобилизованных ферментов (ИФ) в электрический ток. В первом поколении использованы процессы окисления-восстановления перекиси водорода, во втором поколении – медиаторов (Мед), а в третьем поколении используется прямой перенос электронов между редокс-активными биомолекулами и электродом преобразователя. Заимствовано с изменениями из работ [7,31,32].

зависят от присутствия в среде кислорода в качестве акцептора электронов, что может приводить к ошибкам измерения, если концентрация растворенного в среде кислорода изменяется. Поэтому они малоэффективны при измерениях в анаэробных условиях, например, при ишемии.

Биосенсоры первого поколения, основанные на дегидрогеназах, зависят от присутствия никотинамидадениндинуклеотида в восстановленной форме (НАДН), который необходим для продуцирования сигнала, что становится проблематичным при использовании имплантируемых сенсоров. Достоинством сенсоров первого поколения является малое время ответа (около 1 с) и высокая чувствительность. Однако для повышения воспроизводимости данных эти биосенсоры часто нуждаются в предварительной обработке электродов перед работой, а также могут подвергаться влиянию посторонних факторов, вследствие чего может быть необходима коррекция получаемых величин. Эти недостатки могут в наибольшей мере проявляться при измерениях в сложных биологических средах [33].

Биосенсоры второго поколения используют в качестве окислителя медиаторы, функционирующие в качестве переносчиков электронов. Это позволяет работать с использованием низких потенциалов, исключает влияние кислорода и интерференцию с другими химическими агентами. Среди медиаторов наиболее известны ферроцианид и ферроцен. Следует упомянуть также метиленовый синий, метиловый фиолетовый, ализарин желтый, берлинскую лазурь, тионин, лазуриты А и С, толуидиновый синий [34].

В биосенсорах третьего поколения используется электрокатализ, благодаря чему происходит непосредственный перенос электронов между

ферментом и электродом. Для электрического проведения сигнала от места редокс-реакции на ферменте к поверхности электрода используются редокс-полимеры. В настоящее время такие биосенсоры находятся на стадии разработки и мало применяются в практической работе [32], хотя известны многочисленные лабораторные исследования. Например, недавно был создан биосенсор для обнаружения биомаркера заболеваний мочевой системы – пара-гидроксифенилацетата, в котором фермент бактериальная редуктаза был заключен в электропроводящий редокс-полимер, что позволило производить надежные измерения концентрации исследуемого анализируемого соединения [35]. В другом исследовании для выявления фосфорорганических пестицидов был создан высокочувствительный амперометрический ацетилхолинэстеразный биосенсор на основе сопряженного полимера и металлосодержащего нанокompозита [36].

МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫЕ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ БИОСЕНСОРЫ

Биосенсоры могут содержать один или несколько ферментов. Биосенсоры, содержащие два или более ферментов и называемые мультиферментными, более эффективны, чем моноферментные. Основной принцип работы мультиферментных электрохимических биосенсоров базируется на каскадных мультиферментных реакциях [37], содержащих пары редокс- и не редокс-ферментов, способных превращать анализируемые вещества в определенную форму, которая может быть окислена следующей реакцией редокс-фермента [37]. В качестве не редокс-фермента для реакции превращения анализируемого соединения могут использоваться любые воз-

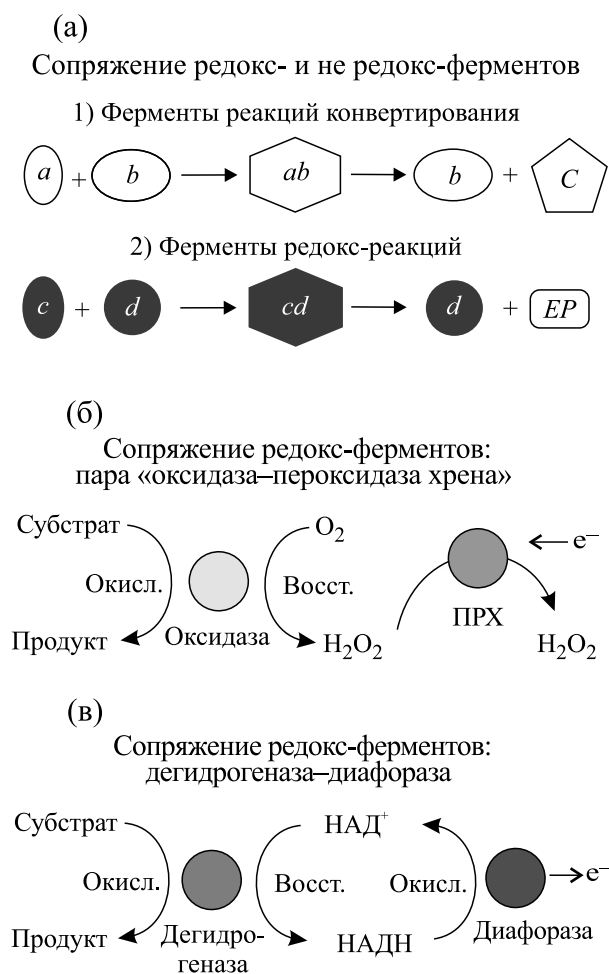


Рис. 3. Типы каскадных мультиферментных реакций: (а) – каскадная реакция не редокс-восстановительной и редокс-восстановительной ферментных пар; (б) – каскадная реакция ферментной пары «оксидаза–пероксидаза хрена»; (в) – каскадная реакция ферментной пары «дегидрогеназа–диафораза»). Обозначения: *a* – субстрат (аналит), *b* – ферменты конверсии, *c* – промежуточный реагент, *d* – редокс-ферменты, *EP* – электроактивный продукт. Заимствовано с изменениями из работы [37].

можные ферменты, такие как киназы, трансферазы, инвертазы и гидролазы. Каскадные ферментативные реакции этих «редокс–не редокс» ферментных пар приводят к образованию перекиси водорода в качестве электроактивного продукта, способного генерировать электрохимические сигналы (рис. 3).

Как и пара «оксидаза–пероксидаза», NAD^+ -зависимая дегидрогеназа, например лактадегидрогеназа, может сочетаться с диафоразой, которая окисляет НАДН. В результате реакции дегидрогеназы с аналитами образуются окисленные субстраты и НАДН. Диафораза повторно окисляет НАДН в окисленную форму NAD^+ и генерирует электрохимические сигналы на электроде. В

этом случае используемая реакция диафоразы эффективно рециркулирует $\text{NAD}^+/\text{НАДН}$ и, наконец, обеспечивает усиленный электрохимический сигнал. В большинстве разработок мультиферментных биосенсоров с применением каскадных химических реакций используются электрохимические методы регистрации сигнала [38].

Первая искусственная биферментная система, включающая ковалентно связанные с полимерным носителем иммобилизованные ферменты гексокиназу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, была создана К. Мосбахом в 1970 г. [39]. Было показано, что эффективность пространственно организованной ферментной системы выше по сравнению с ферментами, находящимися в растворе в свободном виде. Этими же авторами впервые была предложена трехферментная система « β -галактозидаза–гексокиназа–глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа» [40] (рис. 4), которая, как предполагали, позволит наблюдать кумулятивный эффект.

Три фермента были поверхностно связаны с укрепленной поперечно-сшитой полимерной матрицей [41]. Было показано, что кинетическое поведение связанной с матрицей трехферментной системы по сравнению с аналогичной системой, состоящей из трех несвязанных и находящихся в растворе ферментов, было более эффективно. При этом увеличение эффективности связанной системы становится заметнее с увеличением числа участвующих ферментов. В настоящее время известно несколько десятков иммобилизованных мультиферментных комплексов, состоящих из двух, трех, четырех и более ферментов, эффективность которых намного выше, чем у свободных ферментов, за счет локального концентрирования субстратов, входящих в систему [42–44].

НОВЕЙШИЕ РАЗРАБОТКИ В ОБЛАСТИ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ

Технологии использования биосенсоров, основанных на использовании редокс-ферментов, являются одной из наиболее быстро развивающихся областей аналитической химии, что связано с их высокой селективностью, чувствительностью, быстротой и надежностью измерения, компактностью и сравнительно невысокой ценой [2]. Ниже приводятся работы по исследованиям и разработкам мультиферментных биосенсоров для мониторинга некоторых клинически важных метаболитов за последние 10 лет.

Определение содержания холестерина в крови. Высокое содержание холестерина в крови тесно связано с ишемической болезнью сердца, атеро-

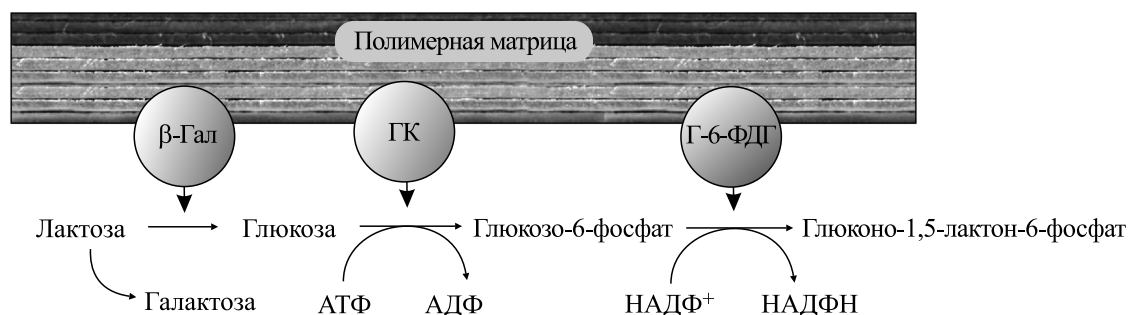


Рис. 4. Схематическое изображение матрикс-связанной трехферментной системы. Сокращения: β -Гал – β -галактозидаза, ГК – гексокиназа, Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа. Заимствовано с изменениями из работы [39].

склерозом, инфарктом миокарда, тромбозом головного мозга, нарушением липидного обмена, гипертонией и т.д., и поэтому разработка чувствительных методов его определения имеет важное значение в диагностических целях [45]. Ранние разработки электрохимического биосенсора для определения холестерина были основаны на прямом переносе электронов между холестериноксидазой (Хол.Окс.) и поверхностью электродов [46,47]. Определение холестерина осуществлялось ферментами холестериноксидазой и холестеринэстеразой (Хол.Эст.).

Позже был создан биосенсор, в котором для определения холестерина использовались ферменты холестериноксидаза и холестеринэстераза, ковалентно иммобилизованные на графитовом электроде, функционализированном графеном [48]. При определении свободного холестерина, электрод «Хол.Окс.–графен/графит» показал чувствительность от 50 до 350 мкМ ($R = -0,9972$) с пределом обнаружения холестерина 5 мкМ, а для общего холестерина совместная иммобилизация Хол.Эст. и Хол.Окс. на модифицированный электрод «(Хол.Эст./Хол.Окс.)–графен/графит» показал линейный диапазон от 50 до 300 мкМ ($R = -0,9982$) с пределом обнаружения 15 мкМ. При этом глюкоза, аскорбиновая кислота и мочевая кислота не вызывали каких-либо помех из-за использования низкого рабочего потенциала.

Для оценки уровня общего холестерина мультиферментным биосенсором титановый электрод был модифицирован тремя ферментами – холестеринэстеразой, холестериноксидазой и пероксидазой хрена (ПРХ) [49]. Каскадная ферментативная реакция для определения холестерина состоит из пар «редокс–не редокс» и «редокс–редокс»-ферментов (рис. 5).

Биосенсор был изготовлен путем совместной иммобилизации трех ферментов на нанопористых сетках золота, непосредственно выращенных на титановой подложке (Ti/NPAu/Хол.Окс.–ПРХ–ChE). Электрохимические характеристики биосенсора «Ti/NPAu/Хол.Окс.–ПРХ–ChE»,

изученные с помощью циклической вольтамперометрии, показали его высокую селективность и чувствительность ($29,33 \text{ мкА} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$). Биосенсор был протестирован на реальных образцах маргарина, сливочного масла и рыбьего жира, показав возможность использования его в качестве инструмента для обнаружения холестерина при контроле качества пищевых продуктов и добавок.

Кроме этого, была сделана попытка разработать трехслойную нанокompозитную пленку на основе наночастиц платины (PtNP) и полипиррола для оценки общего холестерина с использованием импедансной спектроскопии [50]. Изменение импеданса нанобиокompозитных электродов использовали для измерения концентрации олеата холестерина. Импедиметрический биосенсор был изготовлен на основе наночастиц платины и многослойного нанокompозитного электрода из полипиррола. Его преимуществом была простота изготовления [50]. Наночастицы Pt, электрохимически осажденные между двумя слоями полипиррола на стеклянных пластинах из оксида индия и олова (ITO) (PtNP/полипиррол/ITO), обладали высокой электроактивной площадью поверхности и служили благоприятной средой для иммобилизации Хол.Эст. и Хол.Окс., что приводило к эффективному переносу электронов между ферментной системой и электродом. Электрод «Хол.Эст.–Хол.Окс./PtNP/ITO» обнаруживал линейность параметров в диапазоне от $2,5 \cdot 10^{-4}$ до $6,5 \cdot 10^{-3}$ М/л, низкий порог чувствительности ($2,5 \cdot 10^{-4}$ М/л), быстрое время отклика (25 с) и высокую чувствительность ($196 \text{ } \Omega/\text{мМ}/\text{см}^{-2}$). Уникальные особенности нанобиоэлектрода «Хол.Окс.–Хол.Эст./PtNP/полипиррол/ITO» заключались в дешевизне изготовления, простоте измерения, возможности многократного использования, минимизации помех и очень низким значением константы Михаэлиса. Авторы отмечают, что ограничением измерения импеданса является полулогарифмическая зависимость градуировочной кривой и вы-

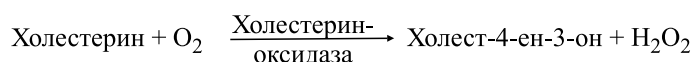
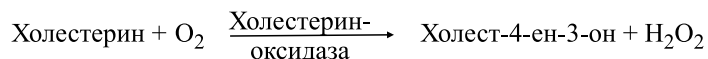
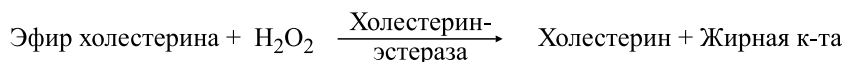
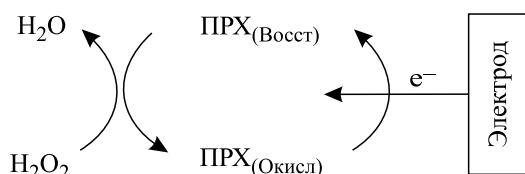
Определение свободного холестеринаОпределение эфира холестеринаГенерация электрохимического сигнала

Рис. 5. Схематическое представление каскадной трехферментной реакции и электрохимической сигнализации. Заимствовано с изменениями из работы [49].

бор репрезентативной схемы из различных графиков Найквиста (амплитудно-фазовая частотная характеристика).

Как отмечалось выше, разработки электрохимического биосенсора холестерина на прямом переносе электронов между холестериноксидазой и поверхностью электродов ограничивало аналитическую эффективность датчиков. Вольтамперометрия как аналитическая техника обеспечивает большую точность, чем амперометрические методы [46,47]. Использование пероксидазы хрена позволяет произвести конвертирование окисленного состояния в восстановленное и обратно с участием гемовой группы ПРХ [45].

Для определения общего холестерина [51] вольтамперометрический датчик был изготовлен путем совместной иммобилизации двух ферментов — холестериноксидазы и ПРХ — на пористом графите. Датчик был избирателен и показывал устойчивость к помехам, таким как аскорбиновая кислота, глюкоза, молочная и мочевая кислоты, обладал высокой стабильностью, чувствительностью ($16 \text{ мкА} \cdot \text{мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$) и линейным диапазоном до 300 моль/дм^3 в условиях, близких к физиологическим (рН 6,86), что определяло его перспективность для использования в клинической практике.

Известно, что ДНК широко используется в качестве элементов биораспознавания в биосенсорах, а также в качестве строительных блоков в наноструктурах [52]. Модифицированные ДНК материалы для иммобилизации ферментов, таких

как пероксидаза хрена [53] и оксидаза глюкозы [54], используются для изготовления биосенсоров.

В исследовании [55] были синтезированы покрытые серебром магнитные наночастицы « $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag-NPs}$ », в которых $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$ (магнетит) служил ядром, а Ag-NP (наночастицы серебра) — оболочкой [55]. Уровни холестерина определяли циклической вольтамперометрией с пределом обнаружения $5,0 \text{ мг/дл}$ и линейным диапазоном от $5,0$ до 195 мг/дл . Было обнаружено, что помехи, вызванные присутствием глюкозы, аскорбиновой кислоты и ацетаминофена, не оказывали существенного влияния на биосенсор, что свидетельствовало о его высокой селективности. Высокая чувствительность биосенсора была обусловлена большой площадью поверхности для эффективной загрузки ферментов. Нанокompозит « $\text{SiO}_2/\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Ag-ДНК}$ » обладал хорошей совместимостью с ферментами, имел хорошую проводимость. В недавно опубликованном обзоре [56] были обсуждены различные типы, а также перспективы дальнейшего совершенствования и коммерциализации биосенсоров холестерина.

Биосенсоры креатинина. В клиническом анализе креатинин, образуемый в результате расщепления креатина и фосфокреатина, может служить важным индикатором функционирования почек [57,58]. Традиционные методы определения креатинина, такие как колориметрический, спектрофотометрический и хроматографический, имеют ряд недостатков, в частности, трудоемкость, необходимость предварительной обра-

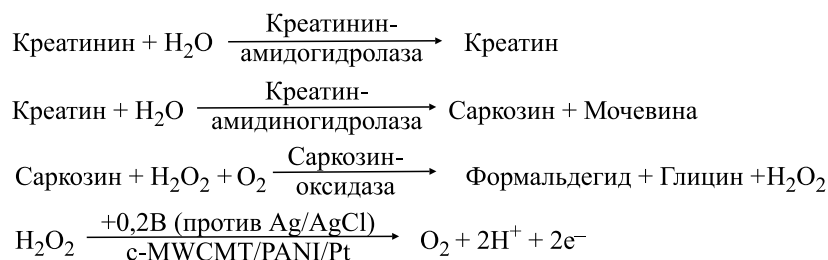


Рис. 6. Схема каскадной трехферментной реакции, применяемой в электрохимическом биосенсоре креатинина. Заимствовано с изменениями из работы [62].

ботки образцов, дорогостоящая аппаратура и высокие требования к квалификации специалистов. Напротив, биосенсорные датчики просты в использовании, экономически эффективны и высокочувствительны [58–60].

Для создания биосенсора креатинина три фермента — креатинин-амидогидролаза, креатин-амидиногидролаза и саркозиноксидаза — были иммобилизованы на платиновом электроде, покрытом пленкой из наночастиц «оксид цинка/хитозан/карбоксилированные карбоновые нанотрубки/полианилин» [61]. Электрод обнаруживал уровень креатинина, равный 0,5 мкМ, в течение 10 с при pH 7,5 и 30°C, характеризовался рабочим диапазоном 10–650 мкМ, чувствительностью 0,03 мкА · мкМ⁻¹ · см⁻² и только 15%-й потерей величины первоначального ответа в течение 120 суток при хранении при 4°C. Устройство было успешно использовано для определения креатинина в сыворотке крови человека. Этими же авторами в другой работе [62] был разработан биосенсор креатинина с использованием карбоксилированной многостенной углеродной нанотрубки (с-МУНТ) и полианилинового модифицированного электрода. Для изготовления мультиферментного модифицированного электрода, нанокомпозитная пленка «с-МУНТ/полианилин» была электроосаждена на поверхность платинового электрода. Для определения креатинина на активированном электроде были ковалентно иммобилизованы ферменты (креатининамидогидролаза, креатинамидиногидролаза и саркозиноксидаза) с использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид/N-гидроксисукцинимидов. Для электрохимической сигнализации использовали прямое окисление перекиси водорода, которая генерировалась в результате каскадной ферментативной реакции (рис. 6).

Биосенсор характеризовался линейным диапазоном ответа от 10 до 750 мкМ креатинина с пределом обнаружения 0,1 мкМ, был успешно использован для определения креатинина в образцах сыворотки человека. В другой работе [60] этими же авторами был разработан биосенсор, в котором коммерческие ферменты — креатиназа

из *Pseudomonas sp.*, креатиназа из *Pseudomonas sp.*, саркозооксидаза из *Bacillus sp.* — были совместно иммобилизованы на наночастицах «оксид железа/хитозан-графт-полианилин» (Fe₃O₄-NPs/CHIT-g-PANI). Биосенсор характеризовался откликом в течение 2 с при pH 7,5 и 30°C, линейной зависимостью от концентрации креатинина в диапазоне от 1 до 800 мкМ, чувствительностью 3,9 мкА · мкМ⁻¹ · см⁻² с пределом обнаружения 1 мкМ (S/N = 3) и 10%-й потери в своем первоначальном ответе после 120 использований в течение 200 суток при хранении при 4°C.

Улучшенный амперометрический биосенсор для обнаружения креатинина был разработан в работе [59] на основе иммобилизации на стеклоуглеродном электроде наночастиц, содержащих креатиназу, креатиназу и саркозооксидазу. Отклик биосенсора составлял 2 с при pH 6,0 в 0,1 М натрий-фосфатном буфере и 25°C. Биосенсор обладал широким линейным диапазоном — от 0,01 мкМ до 12 мкМ с пределом обнаружения 0,01 мкМ. Наблюдалась хорошая корреляция ($R^2 = 0,99$) между значениями сывороточного креатинина в сыворотке здоровых людей и людей, страдающих почечной и мышечной дисфункцией, полученными стандартным ферментативным колориметрическим методом и при использовании биосенсора. В течение 240 суток после регулярного использования и хранения при 4°C потеря первоначальной активности электрода составляла всего 10%.

Определение содержания триглицеридов в крови. Триглицериды являются основными переносчиками жиров в крови. Помимо транспортировки жира триглицериды также действуют как накопленный жир в жировой ткани, которая используется при недостаточном поступлении углеводов. Переносчиками жиров являются липополисахариды крови. Повышенный уровень триглицеридов в крови, превышающий 500 мг/дл, может увеличить риск сердечно-сосудистых заболеваний [63], сосудистой деменции и диабета [64], поэтому определение триглицеридов в крови имеет очень важное значение в клинической диагностике. Биосенсоры триглицеридов, выполненные

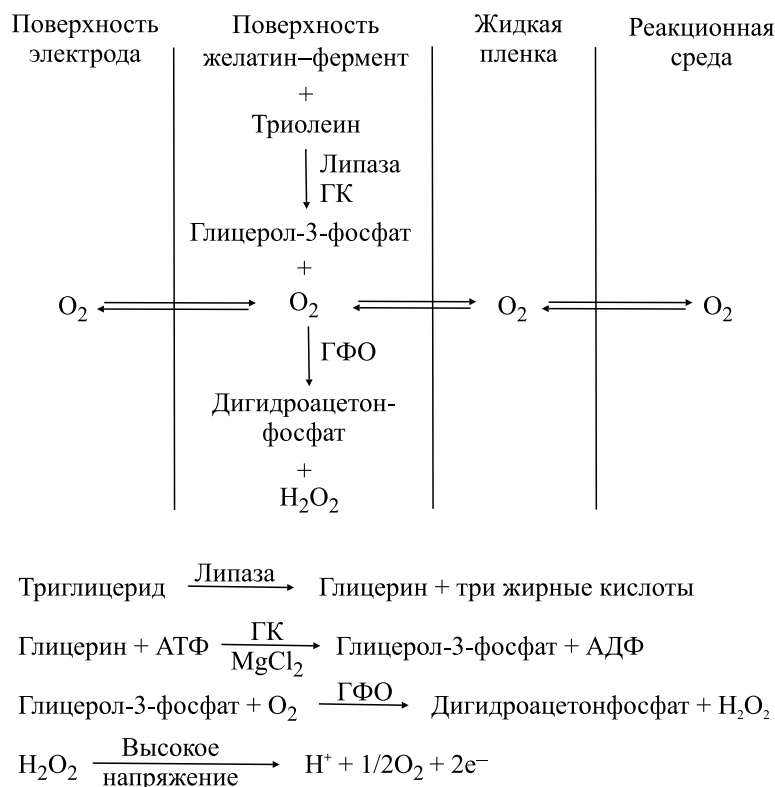


Рис. 7. Амперометрический биосенсор триглицеридов. Сокращения: ГК – глицеролкиназа, ГФО – глицеролфосфатоксидаза. Заимствовано с изменениями из работы [79].

на основе наноматериалов, способны измерять уровень триглицеридов в фруктовых соках, напитках, образцах сыворотки и мочи [65]. В настоящее время указанные биосенсоры недостаточно совершенны для широкого практического применения, требуются дальнейшие исследования для повышения их надежности и эффективности [66,67].

Для определения триглицеридов используют различные методы, такие как колориметрический [68], спектрофотометрический [69], хроматографический [70], флуорометрический [71] и ряд других, в том числе и измерение биосенсорами как наиболее простой, быстрый и экономичный метод. В основе работы биосенсоров на триглицериды лежит принцип генерации электрического сигнала, пропорционального количеству анализируемого соединения [72]. Среди разных классов биосенсоров, например, основанных на проводящих полимерах, оксидах металлов, использующих биодатчики с инфракрасным волокном, микрогелевые оптические биосенсоры, наиболее чувствительными, простыми, специфичными и экономичными были электрохимические биосенсоры [73–76].

Электрохимические биосенсоры на триглицериды классифицируют в соответствии с принципами их измерения на потенциометрические, ам-

перометрические, импедиметрические, кондуктометрические датчики, биосенсор на основе оксида металла, оптический биосенсор, биосенсор на основе микрогеля и биосенсор на основе наночастиц фермента.

Потенциометрические биосенсоры на триглицериды основаны на катализируемом липазой гидролизе трибутирина в глицерин и свободную жирную кислоту (масляная кислота). Производство жирных кислот вызывает изменение pH реакционного буфера, который измеряется с использованием потенциала разомкнутой цепи [77]. В этих биосенсорах генерируется постоянный потенциал, зависящий от концентрации анализируемых соединений [78].

В амперометрическом методе ток прямо пропорционален концентрации анализируемого соединения (триглицеридов) [79], а биосенсор содержит два или три электрода, на которых H_2O_2 генерируется из триглицеридов в каскадной реакции «липаза, глицеролкиназа и глицерол-3-фосфатоксидаза/дегидрогеназа». Продукт H_2O_2 разлагается при высоких напряжениях, чтобы генерировать электроны (рис. 7).

На основе совместной иммобилизации липазы, глицеролкиназы и глицерол-3-фосфатоксидазы на наночастицы «оксид никеля–хитозан»

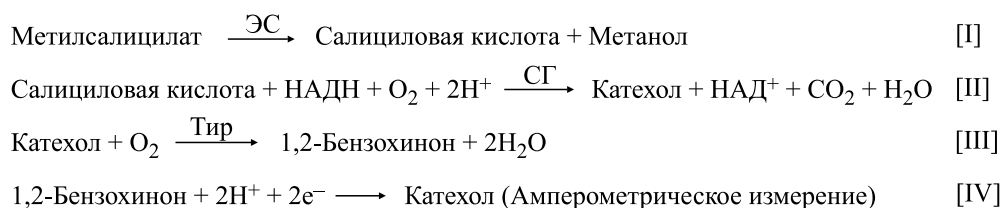


Рис. 8. Схема измерения метилсалицилата с использованием мультиферментного амперометрического датчика. Сокращения: ЭС – эстераза, СГ – салицилатгидролаза, Тир – тирозиназа. Заимствовано с изменениями из работ [87,88].

[80], на хитозан и наночастицы ZnO (ZnONPs) [81], на химически синтезированные частицы «Au/нанокompозит поли(3,4-этилендиокситиофен)полистирен сульфонат» [82] были изготовлены амперометрические биосенсоры на триглицеридах.

Электрохимический биосенсор на триглицеридах был разработан путем нанесения липазы, глицеролкиназы и глицерол-3-фосфатоксидазы на полимерные матрицы посредством электростатических сил и далее стабилизирован посредством ковалентного сшивания. Он позволял измерить уровень триглицеридов в сыворотке крови пациентов, страдающих кожными заболеваниями [83], был прост в изготовлении, обладал стабильной адгезией ферментов, длительным сроком службы электрода. К недостаткам биосенсора можно было отнести неоднородность дисперсии проводящего полимера, химическую нестабильность и низкую технологичность при изготовлении.

Эффективный электрохимический биосенсор на триглицеридах, в котором ферменты были ковалентно ко-иммобилизованы на модифицированный стеклоуглеродный электрод (MNP-SHIT/ZnO-ZnHCF/GCE), представлял значительный интерес, связанный со способностью к значительному усилению сигнала и высокой стабильностью при хранении [84].

В амперометрическом биосенсоре триглицеридов агрегаты наночастиц липазы из поджелудочной железы свиньи, глицеролкиназы из *Cellulomonas sp.* и глицерол-3-фосфатоксидазы из *Aerococcus viridans* сшивали глутаральдегидом и функционализировали цистеамином. Полученные ферментные наночастицы ковалентно иммобилизовали на поликристаллическом Au-электроде через тиолированную связь [85]. Биосенсор показал оптимальный ток при 1,2 В в течение 5 с, при pH 6,5 и 35°C. Кроме того, была получена линейная зависимость между током (мА) и концентрацией триолеина в широком диапазоне низких концентраций. Предел обнаружения триглицеридов составлял 1,0 мкг/мл. Была получена хорошая корреляция ($R^2 = 0,99$) между значениями содержания триглицеридов в сыворотках, измеренными биосенсором и стандартным фермента-

тивным колориметрическим методом. Электрод использовали 180 раз в течение трех месяцев с потерей 50% от его первоначального значения при хранении в сухом месте при 4°C.

Улучшенный амперометрический биосенсор триглицерида, полученный с использованием наночастиц коммерческой липазы из *Candida rugosa*, глицеролкиназы из *Cellulomonas*, а также глицерол-3-фосфатоксидазы из *Aerococcus viridans*, иммобилизованных на электроде карандашного графита, показал оптимальный отклик в течение 2,5 с при pH 7,0 и температуре 35°C. Электрод показал высокую чувствительность ($1241 \pm 20 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{mM}^{-1}$); низкий предел обнаружения (0,1 нМ) и хороший коэффициент корреляции ($R^2 = 0,99$) оцениваемый стандартным ферментативным колориметрическим методом. Биосенсор использовали для определения триглицеридов в сыворотке здорового субъекта и лиц, страдающих гипертриглицеридемией. Потеря его первоначальной активности после продолжительного использования в течение 240 суток при хранении при 4°C составляла всего 20% [86].

Детектирование метилсалицилата. Летучие органические соединения признаны важными маркерными химическими веществами для выявления болезней растений, вызываемых патогенами. Метилсалицилат – одно из наиболее важных летучих органических соединений, выделяемых растениями во время биотического стресса, такого как инфекция патогенными грибами.

Разработка быстрого, достаточно чувствительного и надежного, неразрушающего объекта и пригодного для работы в полевых условиях метода обнаружения метилсалицилата в зараженных растениях очень важно для выявления инфекции на ранней стадии. Для обнаружения метилсалицилата был изготовлен мультиферментный амперометрический датчик [87,88] на основе бифермент-модифицированного трафаретного электрода. Так, для прямого обнаружения метилсалицилата, выделяемого зараженными растениями, был предложен датчик, основанный на трехферментной системе (рис. 8).

Использование мультиферментных электрохимических датчиков метилсалицилата имеет, по сравнению с другими методами, ряд преимуществ.

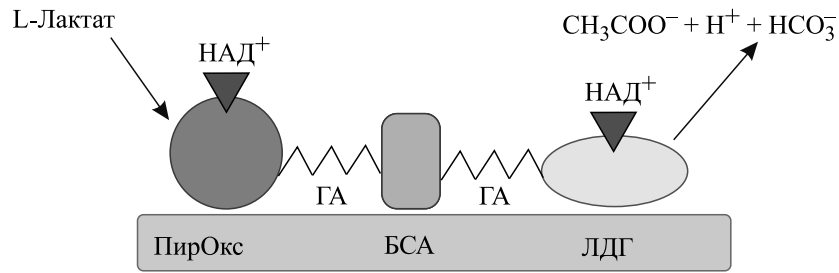


Рис. 9. Схематическое изображение 1-лактат-селективного импедиметрического биосенсора на основе биоселективной мембраны. Сокращения: ГА – глутаровый альдегид, ПирОкс – пируватоксидаза, БСА – бычий сывороточный альбумин, ЛДГ – лактатдегидрогеназа. Заимствовано с изменениями из работы [97].

ществ благодаря их надежности, чувствительности и возможности количественного анализа [87,89]. В предложенной конструкции биосенсора метилсалицилат, высвобождаемый зараженными растениями, гидролизировался эстеразой до метанола и салициловой кислоты (I), а образовавшаяся салициловая кислота была затем превращена в катехол с помощью салицилатгидролазы, также иммобилизованной на графитном электроде (II). Затем полученный катехол был окислен тирозиназой с образованием электроактивного соединения 1,2-бензохинона (III), которое далее восстанавливалось до катехина на поверхности графитного электрода, способствующего генерации электрического тока (IV). Концентрация метилсалицилата была обратно пропорциональна величине тока на катоде. Чувствительность биосенсора, определяемая с помощью циклической вольтамперометрии и амперометрии с постоянным потенциалом, составляла $112,37$ и $282,82 \text{ мкА} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{мМ}^{-1}$, а пределы обнаружения – $22,95$ и $0,98 \text{ мкМ}$ соответственно.

Определение содержания сахаров и их производных. L-лактат является ключевым агентом, образующимся в результате анаэробного метаболизма глюкозы в организме, и его определение очень важно в клинической диагностике [90,91], в спортивной медицине [92,93], в анализе качества пищевых продуктов [94,95]. Среди различных аналитических методов, используемых для определения лактата, электрохимические биосенсоры обладают многими преимуществами, такими как быстрота, высокая специфичность, низкая стоимость и возможность миниатюризации/интеграции в схемы для выполнения автоматического зондирования [73,96].

На основе лактатдегидрогеназы и пируватоксидазы был разработан простой и чувствительный импедансометрический биферментный биосенсор [97], продемонстрировавший высокую стабильность при работе и хранении, а также высокую селективность с пределом обнаружения 17 и 20 мкМ для слоя лактатдегидрогеназы и слоя пируватоксидазы соответственно (рис. 9).

Была предложена оригинальная методика сочетания лактатдегидрогеназы и пируватоксидазы для определения L-лактата, в которой биосенсор готовили методом капельного покрытия лактатдегидрогеназы, НАД⁺ и пируватоксидазы на поверхности электродов графитной печатью, с использованием паров глутарового диальдегида. Определение L-лактата в сложных матрицах показало применимость импедиметрического мультиферментного биосенсора для анализа качества пищевых продуктов и в клинической диагностике.

Для одновременного детектирования кислорода, глюкозы и лактата с использованием одного сенсора, ферменты лактатоксидазы, пероксидазы и глюкозооксидазы были инкапсулированы в полиэлектролитные капсулы микронного размера [98]. Микрокапсулы готовили послойным осаждением противоположно заряженных полиэлектролитов: полиаллиламин гидрохлорида и полистиролсульфоната на частицы CaCO_3 , в результате чего образовывалась оболочка «полистиролсульфонат/полиаллиламина гидрохлорид». Ферменты находились во внутренней части капсулы, в то время как на поверхности были прикреплены флуоресцентные красители, удерживаемые за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий с полиэлектролитными многослойными оболочками [98].

Глюконовая кислота, продукт окисления глюкозы, широко распространена в природе и присутствует в различных пищевых продуктах [99]. Для определения глюконовой кислоты был разработан амперометрический биосенсор, использующий мультиферментный каскад, состоящий из глюконаткиназы и креатинкиназы, саркозиноксидазы и пероксидазы [12]. Ферменты были иммобилизованы между слоями хитозана на поверхности плоского нанокompозитного электрода, содержащего многостенные углеродные нанотрубки. Измерительная среда содержала аденозинтрифосфат, креатинфосфат и гексацианоферрат(II) в качестве редокс-медиатора. Отклик на присутствие в среде глюконовой кислоты проявлял-

ся в виде изменения величины тока, измеряемого при постоянном напряжении – 50 мВ. Биосенсор обладал линейностью в диапазоне от 4 до 620 мкМ с пределом обнаружения 2,6 мкМ, чувствительностью $45,3 \text{ нА} \cdot \text{мкМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ и временем ответа 70 с. Достоинство данной конструкции заключалось также в том, что используемые при создании биосенсора ферменты были доступны, дешевы, стабильны и эффективно функционировали в подходящих рабочих условиях, что позволяло изготавливать чувствительные, надежные и стабильные биосенсоры. Указанный мультиферментный биосенсор был применен для анализа глюконовой кислоты в различных сулах и винах без какой-либо предварительной обработки. Полученные с использованием биосенсора результаты измерений не отличались от результатов эталонных измерений методом жидкостной хроматографии. Биферментный биосенсор на основе пероксидазы хрена и глюкозооксидазы был сконструирован путем гибридизации *in situ* ковалентно связанной органико-неорганической биокompозитной пленки, которая обладала высокой стабильностью в кислотном растворе [100]. Для обнаружения в водных растворах двух различных сахаридов – лактозы и глюкозы – в трехэлектродном амперометрическом биосенсоре глюкозооксидаза и β -галактозидаза были ко-иммобилизованы на графитовом рабочем электроде [11]. Лактозный биосенсор показал линейный диапазон до 0,010 мМ с пределом обнаружения и чувствительностью, равной 0,001 мМ и $850 \pm 81 \text{ мкА/мМ}$ соответственно, и был испытан на реальных образцах – фруктовых соках, обезжиренном молоке и сыворотке.

ДРУГИЕ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫЕ БИОСЕНСОРЫ

Перспективным направлением развития биосенсоров является использование флуоресцентных красителей, которые обычно заключают в капсулы, в различные матрицы [101,102] или оболочки [103], спроектированные таким образом, чтобы облегчить взаимодействие между анализируемым соединением и чувствительным материалом. Широко распространенный подход при изготовлении датчиков такого типа состоит в инкапсулировании чувствительного материала в многослойные наноструктуры, получаемые путем последовательной адсорбции положительно и отрицательно заряженных полиэлектролитов, что впервые было описано в начале 2000-х годов [104,105], в дальнейшем получило значительное развитие и нашло разнообразное применение [106–109].

Так, была показана возможность совместного инкапсулирования ферментов с чувствительными красителями в полиэлектролитные капсулы микронного размера [98]. Многокомпонентные структуры капсул [110] позволили изготовить хи-

мические биосенсоры для обнаружения кислорода и глюкозы, используя одну капсулу [98]. Потенциально, капсулы могут находиться внутри клетки [111,112] и отслеживать изменения концентрации метаболитов на протяжении жизненных циклов клеток. Исследования показали, что миллимолярные концентрации таких веществ, как глюкоза и лактат, могут быть надежно зарегистрированы с помощью флуоресценции. Таким образом, совместное инкапсулирование фермента и флуоресцентного красителя, позволяющее осуществлять оптический мониторинг биологически важных метаболитов в одной микрокапсуле, является уникальной системой для исследования в реальном времени микросреды в цитоплазме.

Известны исследования мультиферментных биосенсорных систем для измерения концентрации фтора и фосфатов [113,114], для обнаружения ацетилхолина [115], аргинина [116], аспартаттрансаминазы и аланинтрансаминазы с использованием мультифермент-модифицированной поверхности электрода [117,118], трансаминаз в сыворотке крови [117], секреторной фосфолипазы группы 2-ПА, биомаркера бактериальной сепсисной инфекции [119], лизина как показателя качества пищевых продуктов [120], для обнаружения и контроля нуклеозидов [121], а также аналогов нуклеозидов, представляющих универсальное семейство лекарств широкого спектра действия [122].

Современные методы иммобилизации позволяют создавать не только мультиферментные комплексы, но и связывать их с целыми клетками, субклеточными структурами [123] и микроорганизмами [124]. Использование иммобилизованных клеток позволяет исключить необходимость выделения и очистки требуемых ферментов. Живая клетка, в отличие от выделенного фермента, представляет собой готовый биотехнологический реактор, в котором реализуются процессы, приводящие к образованию конечного продукта. Они позволяют получать естественные мультиферментные системы, осуществляющие многостадийные химические преобразования. С использованием живых клеток создано много различных биосенсоров [125,126], в которых ключевым вопросом является метод иммобилизации клеток [127,128].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние годы наблюдалось быстрое развитие технологий создания мультиферментных биосенсоров, предназначенных для использования в биомедицине, фармакологии, пищевой промышленности, сельском хозяйстве, мониторинге окружающей среды. Эти устройства отличаются компактностью и портативностью, высокая

чувствительность и селективность, простота и удобство в использовании, поскольку они не требуют проведения сложных подготовительных работ для измерения.

Биосенсоры на основе каскадных ферментативных реакций обладают рядом преимуществ в сравнении с моноферментными биосенсорами. Важным фактором в разработке эффективных биосенсоров, основанных на каскадных реакциях, является подбор подходящих ферментных пар, для которых требуются относительное сходство условий функционирования, включая сходство оптимальных значений pH, температурных профилей, концентрации метаболитов.

Современные тенденции развития указанной техники направлены на дальнейшую минимизацию их размеров, повышение их надежности чувствительности, избирательности, устойчивости к действию посторонних агентов и факторов, снижающих время службы этих устройств. Важным аспектом является также снижение стоимости изготовления и расширение аспектов применения измерительных устройств.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (проект AP05134201)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Asal, Ö. Özen, M. Şahinler, et al., *Sensors (Basel)* **18** (6), 1924 (2018).
2. T. Monteiro and M. G. Almeida, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **49**, 44 (2019).
3. A. Gahlaut, V. Hooda, A. Gothwal, et al., *Crit. Rev. Anal. Chem.* **49**, 32 (2019).
4. B. Bucur, F.-D. Munteanu, J.-L. Marty, et al., *Biosensors (Basel)* **18** (2), 27 (2018).
5. L. El Harrad, I. Bourais, H. Mohammadi, et al., *Sensors (Basel)* **18** (1), 164 (2018).
6. I. Palchetti, *Mini-Rev. Med. Chem.* **16**, 1125 (2016).
7. H. H. Nguyen, S. H. Lee, U. J. Lee, et al., *Materials (Basel)* **12**, 121 (2019).
8. M. Asif, A. Aziz, M. Azeem, et al., *Adv. Colloid Interface Sci.* **262**, 21 (2018).
9. L. Farzin, M. Shamsipur, L. Samandari, et al., *Mikrochim. Acta* **185**, 276 (2018).
10. D. Baratella, E. Bonaiuto, M. Magro, et al., *Amino Acids* **50**, 1187 (2018).
11. M. Portaccio and M. Lepore, *J. Sensors* **2017** (2), 1 (2017).
12. M. Stredansky, *Int. J. Electrochem. Sci.* **12** (2), 1183 (2017).
13. R. Monošík, M. Stred'anský, and E. Šturdík, *J. Clin. Lab. Anal.* **26**, 22 (2012).
14. M. S. Thakur and K. V. Ragavan, *J. Food Sci. Technol.* **50**, 625 (2013).
15. N. Patel, S. Shahane, Shivam, et al., *Recent Pat Biotechnol.* **13**, 19 (2019).
16. A. L. Campaña, S. L. Florez, M. J. Noguera, et al., *Biosensors (Basel)*, **9** (1), 41 (2019).
17. D. Bagal-Kestwal, R. M. Kestwal, B.-C. Hsieh, et al., *Biosens. Bioelectron.* **26**, 118 (2010).
18. M. Diaconu, S. C. Litescu, and G. L. Radu, *Mikrochim. Acta* **172** (1–2), 177 (2011).
19. R. Spricigo, R. Dronov, F. Lisdat, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **393**, 225 (2009).
20. J. Simon, E. Flahaut, and M. Golzio, *Materials (Basel)* **12** (4), 624 (2019).
21. L. F. Fernandes, G. E. Bruch, A. R. Massensini, et al., *Front. Neurosci.* **12**, 453 (2018).
22. Y. Zhou, Y. Fang, R. P. Ramasamy, *Sensors (Basel)*, **19** (2), 392 (2019).
23. M. Adeel, M. Bilal, T. Rasheed, et al., *Int. J. Biol. Macromol.* **120**, 1430 (2018).
24. Á. Torrinha, C. G. Amorim, M. C. B. S. M. Montenegro, et al., *Talanta* **190**, 2357 (2018).
25. B. Wang, U. Akiba, and J.-I. Anzai, *Molecules* **22** (7), 1048 (2017).
26. V. Hooda, A. Gahlaut, A. Gothwal, et al., *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **46**, 626 (2018).
27. S.-C. Park, E.-J. Cho, S.-Y. Moon, et al., In *Materials of World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering – 2006*, Ed. by S.-I. Kim and T. Suk Suh (Springer, New York, 2007).
28. D. Grieshaber, R. MacKenzie, J. Vörös, et al., *Sensors (Basel)* **8**, 1400 (2008).
29. P. Damborský, J. Švitel, J. Katrlík, *Essays Biochem.* **60**, 91 (2016).
30. M. Pohanka, *Materials (Basel)*, **11** (3), 448 (2018).
31. S. K. Sharma and R. M. Leblanc, *Anal. Biochem.* **535**, 1 (2017).
32. G. Rocchitta, A. Spanu, S. Babudieri, et al., *Sensors (Basel)* **16** (6), 680 (2016).
33. S. V. Dzyadevych, V. N. Arkhypova, A. P. Soldatkin, et al., *Innovation Res. BioMed. Engineer.* **29** (2–3), 171 (2008).
34. A. Chaubey and B. D. Malhotra, *Biosens. Bioelectron.* **17**, 441 (2002).
35. S. Teanphonkrang, A. Ernst, S. Janke, et al., *ACS Sens.* **4**, 1270 (2019).
36. P. Zhang, T. Sun, S. Rong, et al., *Bioelectrochemistry* **127**, 163 (2019).
37. Y. D. Han, Y. H. Jang, and H. C. Yoon, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **140**, 221 (2014).
38. D. R. Bagal-Kestwal, M. H. Pan, and B.-H. Chiang, *Biosens. Bioelectron.* **121**, 223 (2018).
39. K. Mosbach and B. Mattiasson, *Acta Chem. Scand.* **24**, 2093 (1970).
40. B. Mattiasson and K. Mosbach, *Biochim. Biophys. Acta – Enzymology* **235** (1), 253 (1971).
41. R. Axén, J. Porath, and S. Ernback, *Nature* **214**, 1302 (1967).

42. Z. Findrik and Đ. Vasić-Rački, *Chem. Biochem. Engineer. Quart.* **23**, 545 (2009).
43. S. Schoffelen and J. C. M. van Hest, *Soft Matter* **8** (6), 1736 (2012).
44. X. Wang, Z. Li, J. Shi, et al., *ACS Catal.* **4** (3), 962 (2014).
45. A. Gahlaut, V. Hooda, V. Dhull, et al., *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **46**, 472 (2018).
46. J. J. Gooding, *Electrochim. Acta* **50** (15), 3049 (2005).
47. J. Wang, *Electroanalysis* **17** (15–16), 1341 (2005).
48. R. Manjunatha, G. Sh. Suresh, J. S. Melo, et al., *Talanta* **99**, 302 (2012).
49. A. Ahmadalinezhad and A. Chen, *Biosens. Bioelectron.* **26**, 4508 (2011).
50. K. Singh, R. Chauhan, P. R. Solanki, et al., *Int. J. Org. Chem.* **3** (4), 262 (2013).
51. K. V. Derina, E. I. Korotkova, E. V. Dorozhko, et al., *Procedia Chemistry* **10**, 513 (2014).
52. H. Pei, X. Zuo, D. Pan, et al., *NPG Asia Materials*, **5** (6), e51 (2013).
53. Y. Liu, L. M. Hu, and S. Q. Yang, *Microchim. Acta* **160** (3), 357 (2008).
54. J. Leng, W.-M. Wang, L.-M. Lu, et al., *Nanoscale Res. Lett.* **9**, 99 (2014).
55. R. K. Satvekar, A. P. Tiwari, S. S. Rohiwal, et al., *J. Mater. Engineer. and Performance* **24** (12), 4691 (2015).
56. V. Narwal, R. Deswal, B. Batra, et al., *Steroids* **143**, 6 (2019).
57. J. T. Kastl, *Semin Fetal Neonatal Med.* **22**, 83 (2017).
58. P. Delanaye, E. Cavalier, and H. Pottel, *Nephron* **136**, 302 (2017).
59. P. Kumar, R. Jaiwal, and C. S. Pundir, *Anal. Biochem.* **537**, 41 (2017).
60. C. S. Pundir, P. Kumar, and R. Jaiwal, *Biosens. Bioelectron.* **126**, 707 (2019).
61. S. Yadav, R. Devi, A. Kumar, et al., *Biosens. Bioelectron.* **28**, 64 (2011).
62. S. Yadav, A. Kumar, and C. S. Pundir, *Anal. Biochem.* **419**, 277 (2011).
63. M. Miller, N. J. Stone, C. Ballantyne, et al., *Circulation* **123**, 229233 (2011).
64. C. Raffaitin, H. Gin, J.-P. Empana, et al., *Diabetes Care* **32**, 169 (2009).
65. C. S. Pundir and V. Narwal, *Biosens. Bioelectron.* **100**, 214 (2018).
66. M. Pohanka, *Molecules* **24** (3), 616 (2019).
67. R. Cánovas, M. Cuartero, and G. A. Crespo, *Biosens. Bioelectron.* **130**, 110 (2019).
68. M. Sugiura, T. Oikawa, K. Hirano, et al., *Clin. Chim. Acta* **81**, 125 (1977).
69. M. C. Mochón and J. A. Leyva, *Clin. Chim. Acta* **142**, 281 (1984).
70. J. W. Brunnekreeft and B. Leijnse, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* **24**, 4459 (1986).
71. A. J. Mendez, C. Cabeza, and S. L. Hsia, *Anal. Biochem.* **156**, 386 (1986).
72. G. Evtugyn, *Biosensors* (Springer, Berlin, Heidelberg, 2014).
73. C. S. Pundir, V. Narwal, and B. Batra, *Biosens. Bioelectron.* **86**, 777 (2016).
74. I. Palchetti, S. Laschi, and M. Mascini, *Methods Mol. Biol.* **504**, 115 (2009).
75. P. R. Solanki, C. Dhand, A. Kaushik, et al., *Sensors and Actuators B: Chemical* **141** (2), 551 (2009).
76. A. Yücel, H. M. Özcan, and A. Sağiroğlu, *Prep. Biochem. Biotechnol.* **46**, 78 (2016).
77. R. R. Reddy, A. Chadha, E. Bhattacharya, *Biosens. Bioelectron.* **16**, 313 (2001).
78. K. Nakazato, In *State of the Art in Biosensors – General Aspects*, Ed. by T. Rinken (InTech, 2013).
79. V. K. Khanna, *Sensor Rev.* **28** (1), 39 (2008).
80. J. Narang, N. Chauhan, and C. S. Pundir, *Int. J. Biol. Macromol.* **60**, 45 (2013).
81. J. Narang and C. S. Pundir, *Int. J. Biol. Macromol.* **49**, 707 (2011).
82. A. Phongphut, C. Sriprachuabwong, A. Wisitsoraat, et al., *Sensors and Actuators B Chemical* **178**, 501 (2013).
83. C. Y. Jeong, Y. D. Han, J. H. Yoon, et al., *J. Biotechnol.* **175**, 7 (2014).
84. J. Narang, N. Chauhan, N. Malhotra, et al., *Adv. Sci. Lett.* **20** (7), 1331 (2014).
85. C. S. Pundir and V. Aggarwal, *Anal. Biochem.* **517**, 56 (2017).
86. V. Narwal and C. S. Pundir, *Enzyme Microb. Technol.* **100**, 11 (2017).
87. Y. Fang, Y. Umasankar, and R. P. Ramasamy, *Biosens. Bioelectron.* **81**, 39 (2016).
88. Y. Fang, H. Bullock, S. A. Lee, et al., *Biosens. Bioelectron.* **85**, 603 (2016).
89. Y. Fang and R. P. Ramasamy, *ECS Trans.* **85** (13), 1359 (2018).
90. J. Bakker, A. Pinto de Lima, *Crit. Care* **8**, 96 (2004).
91. F. Valenza, G. Aletti, T. Fossali, et al., *Crit. Care* **9**, 588 (2005).
92. T. Stellingwerff, P. J. Leblanc, M. G. Hollidge, et al., *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **290**, E1180 (2006).
93. N. Nikolaus and B. Strehlitz, *Microchim. Acta* **160** (1–2), 15 (2008).
94. K. Kriz, L. Kraft, M. Krook, et al., *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3419 (2002).
95. F. K. Stekelenburg and M. L. Kant-Muermans, *Int. J. Food Microbiol.* **66**, 197 (2001).
96. K. Rathee, V. Dhull, R. Dhull, et al., *Biochem. Biophys. Rep.* **5**, 35 (2016).
97. D. Chan, M. M. Barsan, Y. Korpan, et al., *Electrochim. Acta* **231**, 209 (2017).
98. L. I. Kazakova, L. I. Shabarchina, S. Anastasova, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 1559 (2013).
99. S. Ramachandran, P. Fontanille, A. Pandey, et al., *Food Technol. Biotechnol.* **44**, 185 (2006).
100. F. Li, Z. Wang, Y. Feng, *Sci. China Ser. B – Chemistry* **52** (12), 2269 (2009).
101. D. A. Nivens, Y. Zhang, and S. M. Angel, *Anal. Chim. Acta* **376** (2), 235 (1998).
102. S. Sas, M. Danko, V. Bizovská, et al., *Appl. Clay Sci.* **138**, 25 (2017).

103. D. Lu, L. Yang, Z. Tian, et al., *RSC Adv.* **2** (7), 2783 (2012).
104. T. A. Duchesne, J. Brown, K. B. Guice, et al., *Sensors and Materials* **14** (6), 293 (2002).
105. M. J. McShane, *Diabetes Technol. Ther.* **4**, 533 (2002).
106. L. R. Bornhoeft, A. Biswas, and M. J. McShane, *Biosensors (Basel)* **7**, 8 (2017).
107. P. Rivera Gil, M. Nazareus, S. Ashraf, et al., *Small* **8**, 943 (2012).
108. A. Biswas, A. T. Nagaraja, and M. J. McShane, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 21193 (2014).
109. Q. Zhao, X. Rong, L. Chen, et al., *Talanta* **114**, 110 (2013).
110. M. Delcea, A. Yashchenok, K. Videnova, et al., *Biosci.* **10**, 465 (2010).
111. S. De Koker, B. G. De Geest, C. Cuvelier, et al., *Adv. Funct. Mater.* **17** (18), 375 (2007).
112. A. M. Pavlov, A. V. Sapelkin, X. Huang, et al., *Macromol. Biosci.* **11**, 848 (2011).
113. V. Rangelova, A. Pandelova, and N. Stoyanov, *Annals of the Faculty of Engineering Hunedoara* **9** (2), 83 (2011).
114. S. Ganesan, K. Saravanakumar, and L. Rajendran, *Int. J. Comput. Math.* **2014** (2), 1 (2014).
115. S. Hou, Z. Ou, Q. Chen, et al., *Biosens. Bioelectron.* **33**, 44 (2012).
116. N. Stasyuk, O. Smutok, G. Gayda, et al., *Biosens. Bioelectron.* **37**, 46 (2012).
117. Y. D. Han, S. Y. Song, J. H. Lee, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* **400**, 797 (2011).
118. M. Jamal, O. Worsfold, T. McCormac, et al., *Biosens. Bioelectron.* **24**, 2926 (2009).
119. N. Nurhanan Nik Mansor, T. Toh Leong, E. Safitri, et al., *Sensors (Basel)* **18**, 686 (2018).
120. B. Bóka, M. Korózs, M. Nánási, et al., *Electroanalysis* **27** (3), 817 (2015).
121. P. Muthu and S. Lutz, *ChemMedChem.* **11**, 660 (2016).
122. L. P. Jordheim, D. Durantel, F. Zoulim, et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 447 (2013).
123. N. Katsanakis, A. Katsivelis, and S. Kintzios, *Sensors (Basel)* **9**, 378 (2009).
124. J. W. Lim, D. Ha, J. Lee, et al., *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, 61 (2015).
125. N. A. Wan, J. Wan, and L. Sh. Wong, *Int. J. Chem. Env. Biol. Sci.* **2** (1), 52 (2014).
126. Q. Gui, T. Lawson, S. Shan, et al., *Sensors* **17** (7), 1623 (2017).
127. *Applications of Cell Immobilisation Biotechnology*, Ed. by V. Nedović and R. Willaert (Springer, Netherlands, 2005).
128. E. M. T. El-Mansi, C. F. A. Bryce, A. R. Allman, et al., *Fermentation microbiology and biotechnology* (CRC Press, 2011).

Amperometric Multi-Enzyme Biosensors: Development and Application (Short Review)

S.Zh. Ibadullaeva*, N.O. Appazov*, Yu.S. Tarahovsky**, E.A. Zamyatina**,
M.G. Fomkina**, and Yu.A. Kim***

*Korkyt Ata Kyzylorda State University, Aiteke Bi 29A, Kyzylorda, 120008 Kazakhstan

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

***Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

In the last decade, significant progress has been made in the development of enzyme biosensors that are used in pharmacology, clinical practice, agriculture, in food quality control, monitoring of infectious diseases and the spread of environmental pollution factors. The functioning of amperometric multienzyme biosensors is based on natural recognition mechanisms. To increase the efficiency, the biosensor design should allow analytes to freely interact with enzymes involved in catalytic reactions, which requires knowledge of both the properties of the medium under study and the properties of the analyte itself. In order to detect, recognize and estimate the concentration of analytes in the medium, it is also necessary to take into account factors that can suppress or distort the signal, which may be due to the interaction of the biosensor components with each other and with the molecules of the studied medium. These factors may change not only during storage or after repeated use of the biosensor, but also during a single measurement. In the process of development of measuring technology, significant progress has been made in improving the design of biosensors. The proposed review considers the most interesting and promising trends in the development of amperometric multienzyme biosensors emerging in recent years.

Keywords: biosensor, multienzyme complexes, cascade reaction, metabolites