

УДК 543.25

ОСНОВНЫЕ ПРОБЛЕМЫ И НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ БИОСЕНСОРОВ*

© 1995г. В.Е. Курочкин, Е.Д. Макарова

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 23.05.95

ВВЕДЕНИЕ

За прошедшие 10 лет достигнуты значительные успехи в решении теоретических и некоторых практических задач в области конструирования биосенсоров, о чем свидетельствует создание теоретических моделей, адекватно описывающих механизм функционирования и отклик некоторых ферментных электродов [1, 2 - 5], а также появление на рынках серийных ферментных анализаторов, предназначенных для решения задач клинической диагностики и экологии. В то же время многие проблемы так и остались нерешенными, что проявляется в формулировке задач и основных направлений развития биосенсоров, характерной для начала 90-х годов, которые, в основном, сводятся к следующим [1, 6, 7, 8]:

- 1) Совершенствование характеристик уже известных биосенсоров – повышение чувствительности, стабильности, селективности, скорости определения, воспроизводимости показаний, увеличению рабочего диапазона, обеспечение возможности длительного использования.
- 2) Миниатюризация и разработка технологий формирования ферментных пленок с прецизионным нанесением их в заданную область с целью создания мультисенсорных систем.
- 3) Исследование нетрадиционных физико-химических датчиков и биорецепторов с целью построения на их основе принципиально новых устройств с более широкими функциональными возможностями.

По нашему мнению, появление последних двух направлений отражает, с одной стороны, опережающее развитие микроэлектронных технологий и биотехнологии, а с другой — сомнение в перспективности традиционных подходов к разработке биосенсоров и неудовлетворенность технико-аналитическими характеристиками существующих сенсоров.

В свою очередь, дополнительные требования к потребительским качествам и характеристикам разрабатываемых биосенсоров возникают при их практическом использовании вследствие специфики реальных анализируемых объектов и областей применения. Например, применение биосенсоров в биотехнологии ограничено неполным соответствием их характеристик жестким требованиям, предъявляемым к датчикам, предназначенным для использования в технологических процессах [9]. По мнению автора [9], иммобилизация ферментов и устранение шумовых сигналов уже не являются проблемой при разработке биосенсоров для контроля биотехнологических процессов, и основное внимание должно быть уделено таким вопросам как обеспечение долговременной работы и непрерывности контроля, стабильность показаний биосенсоров и повышение термостабильности ферментов.

Основными препятствиями для применения биосенсоров в анализе объектов окружающей среды и экоаналитического контроля являются не только проблемы стабильности и сохранения активности иммобилизованных ферментов, но и влияние высоких и низких температур, бактериальные загрязнения, а также необходимость получе-

* Работа выполнена по гранту INTAS-1563.

ния высокочистых биологических компонентов, сложность их защиты от вредного воздействия среды и недостаточная селективность первичных преобразователей, получаемых на основе ферментов [10, 11].

СТАБИЛИЗАЦИЯ И ИММОБИЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Для решения указанных проблем применяются различные способы, основанные как на модифицировании принципов построения анализаторов, так и на изменении физико-химических свойств самих ферментов или структуры чувствительных элементов. Так, например, в работах [8, 12, 13] показано, что комбинация проточно-инжекционного анализа (FIA) и биосенсоров может улучшить характеристики обоих аналитических методов и представляет собой новый способ решения проблем аналитического контроля биопроцессов, сточных вод, состава биосред. При этом существуют два варианта технического решения: в первом варианте ферментативная реакция осуществляется в специальном реакторе с иммобилизованным ферментом, а регистрацию проводят на электроде, помещенную в отдельной ячейке [8, 12, 13]. К достоинству метода относится возможность проведения анализа на многие субстраты при замене реактора, а также малые объемы анализируемых проб (5 - 20 мкл). При втором варианте решения в проточную ячейку помещают непосредственно биосенсоры, а подача пробы (часто разбавленной) осуществляется в непрерывном или периодическом режимах. Возможность встраивания в систему дополнительных разделительных мембран (например, диализных [13]) увеличивает селективность метода, а организация "щадящего" режима работы равносильна увеличению времени жизни и стабильности ферментной системы. В то же время техническая и технологическая сложность аналитической системы возрастает.

Стабилизация самих ферментов может осуществляться разными - физическими и химическими - способами [14]:

- 1 — изменением температуры, защитой от света, облучением;
- 2 — добавлением стабилизаторов;
- 3 — химической модификацией;
- 4 — включением ферментов в гели, таблетки, микрокапсулы, липосомы.

Если физические способы повышения стабильности ферментов пригодны, в основном, для увеличения сроков хранения ферментных препаратов, то остальные могут использоваться при разработке и выпуске биосенсоров.

Способ иммобилизации и материал матрицы обычно выбираются в зависимости от способа и цели применения ферментных мембран. По данным японских исследователей [15], лучшей матрицей для иммобилизации ферментов является натуральный шелк, причем иммобилизованные на шелке ферменты особенно устойчивы к действию температуры. Полагают, что шелковое волокно с иммобилизованными на нем ферментами станет важной частью многих биореакторов.

Для иммобилизации ферментов при проектировании проточных реакторов применяют:

- ковалентное связывание с носителями (целлюлозой, агарозой, декстраном и др.);
- физическую адсорбцию химически модифицированных ферментов пористыми носителями (активированным углем, силикагелем);
- ионное связывание фермента с носителем;
- образование лигандных мостиков между ферментами и эффекторами, ингибиторами, кофакторами, присоединенными к носителям разной природы;
- сшивку ферментов бифункциональными сшивающими реагентами (глутаровым альдегидом, диизоцианатом);
- включение ферментов в матрицу полимерного геля (агара, коллагена, полиакриламида) [16].

Матрицы, используемые при формировании ферментных сенсоров, должны удовлетворять целому ряду требований: технологичность изготовления, хорошая адгезия к поверхности преобразователя, диффузная проницаемость для молекул субстратов и продуктов реакции ферментативного гидролиза, высокий уровень включения ферментов и сохранения их активности при иммобилизации [17].

При этом способ изготовления матриц должен быть по возможности простым, малочувствительным к случайным отклонениям условий от идеальных и достаточно дешевым. Кроме того, надежность и стабильность работы электрохимических (потенциометрических) сенсоров во многом зависит от ка-

чества поверхности самого электрода, поэтому для улучшения характеристик электродов обычно применяют полимерные покрытия [18].

Проверка различных способов получения и состава полимерных покрытий на соответствие всем этим требованиям показала, что при изготовлении биосенсоров потенциметрического типа лучшим является метод высокочастотной плазменной полимеризации акролеина [18, 19].

При разработке ферментных электродов амперометрического типа применяются, в основном, три способа иммобилизации ферментов на поверхности твердых электродов: необратимая адсорбция, ковалентное связывание с функциональными группами, генерируемыми на поверхности электродов, и встраивание ферментов в электронпроводящие полимерные пленки с помощью соиммобилизации [20].

Разработку микроферментных электродов амперометрического типа (глюкозных датчиков) удалось реализовать с помощью электроиммобилизации глюкозооксидазы в виде 1 – 4 монослоев непосредственно на поверхности платины, причем время отклика такого микродатчика составляло всего 2 секунды [21]. К настоящему времени уже отработаны методики изготовления микроэлектродов из платины (диаметр 50 – 100 мкм) и иммобилизации на их поверхности глюкозооксидазы включением молекулы фермента в поры "платиновой черни", формируемой на поверхности электрода, причем пористая матрица может формироваться как в гальваностатическом, так и потенциостатическом режимах [7].

Сорбционная иммобилизация фермента – при сохранении его активности – может проводиться двумя способами: после платинизирования платины или одновременно с формированием подложки и микрочастиц платины. В амперометрическом режиме работы ($= 0,6$ В) чувствительность определения глюкозы составляет 0,5 мкмоль/л, время отклика – 3 с (в ячейке с перемешиванием), а в режиме импульсной вольтамперометрии время отклика уменьшается до 1 с, объем пробы – до 2 мкл при сохранении широкого линейного диапазона 1 – 20 мкмоль/л [7].

Еще одним направлением миниатюризации биосенсоров, оцениваемым как высокоперспективное, является применение полевых транзисторов (ПТ), к преимуществам которых относят – кроме миниатюрности – дешевизну, простоту, низкое выходное со-

противление, малое время отклика, возможность создания многофункциональных и имплантируемых датчиков [7, 8, 10, 22 – 29], однако и в настоящее время в этой области существует целый комплекс нерешенных научных и технологических проблем [8, 26].

Одной из таких проблем при создании полупроводниковых биосенсоров является обеспечение совместимости биологического материала и поверхности преобразователя (SiO_2 , Al_2O_3 , Ta_2O_5 , ZrO_2) [17, 30], поэтому разработка способов иммобилизации ферментов в этом случае имеет особенно важное значение.

Кроме того, существует целый ряд объективных трудностей, препятствующих быстрому внедрению самих ионселективных ПТ на предприятиях микроэлектронной промышленности, о которых обычно не сообщается в большинстве публикаций и которые подробно рассмотрены в работе [31]:

- 1) необходимость проведения нестандартных технологических операций (нанесение иончувствительных пленок, сборка и герметизация);
- 2) невозможность проверки работоспособности приборов до разделения полупроводниковой пластины на отдельные кристаллы;
- 3) сложность метрологической аттестации микропреобразователей при наличии естественного разброса их параметров;
- 4) необходимость устранения временного и температурного дрейфа, а также электронного шума [32];
- 5) необходимость разработки принципиально нового электрода сравнения;
- 6) сложность интеграции в одном корпусе чувствительного элемента и электрода сравнения, а также измерительного преобразователя, представляющего выходной сигнал в нормализованном виде, причем основным условием такой интеграции является сохранение миниатюрности устройства.

Привлекательность идеи применения ферментных ПТ (ФПТ) не меркнет в течение долгого времени, однако число технологических, конструктивных и схематических задач, которые требуется решить на практике для того, чтобы потенциальные достоинства и преимущества ФПТ стали реальными, очень велико. В начале 90-х годов в наибольшей степени были близки к решению этих задач японские фирмы.

В настоящее время основными электродами, применяемыми при разработке ферментных электродов (в том числе и миниатюрных), являются платиновые, и исследования по модифицированию, усовершенствованию, а также по разработке новых технологий изготовления таких систем проводятся наиболее широко. Несмотря на серийное производство глюкозоанализаторов и других анализаторов состава крови, целью исследований, проводимых в последние годы, по-прежнему остается обеспечение возможности определения глюкозы в цельной крови, увеличение стабильности, времени жизни и рабочих диапазонов биосенсоров.

В Лондонском Королевском колледже разработана новая технология изготовления биосенсоров на глюкозу [33], которые основаны на катализе глюкозооксидазной реакции окисления глюкозы, однако – в отличие от других биосенсоров подобного типа – окисление восстановленной формы фермента происходит безмедиаторно. Материалом электрода является бумага, к которой "пришит" мелкодисперсный платиновый катализатор. На поверхность такого электрода наносится фермент с помощью физической адсорбции или ковалентным связыванием. Датчик характеризуется уникальной стабильностью: период полуинактивации при 4°C составляет 3,2 года, время непрерывной работы – свыше 250 часов, время отклика – менее 3с.

Одновременно с разработкой платиновых ферментных электродов продолжают поиски других – более дешевых – электродных материалов. Так, вместо Pt предлагается использовать титан, покрытый слоем IrO_2 , RuO_2 или SnO_2 [34], вольфрам [35], углеродные материалы (графит, стеклоуглерод, синтетические активные угли сферической грануляции) [36, 37], однако по аналитическим характеристикам биосенсоры, полученные на основе этих материалов, пока что уступают ферментным электродам на основе платины. Повышенный интерес, проявляемый исследователями к углеродным материалам, объясняется возможностью иммобилизации фермента с помощью физической адсорбции или ковалентной сшивки непосредственно с поверхностью электрода, что позволило бы исключить из конструкции ферментсодержащую мембрану [37]. В то же время высокие перенапряжения пероксидной реакции на углеродных материалах (рабочие потенциалы ферментных электродов лежат в интервале 0,7 – 0,9 В) приводят к увеличению фоновых токов и мо-

гут способствовать инактивации иммобилизованных ферментов [37], а также неблагоприятно сказываться на структуре углеродных материалов.

ТЕХНИКА ПОЛУЧЕНИЯ СЕНСОРОВ

Наибольшие успехи при разработке биосенсоров были достигнуты благодаря созданию электрохимических сенсоров амперометрического типа, однако ряд вопросов остается по-прежнему без оптимального практического решения [8]. В первую очередь это относится к обеспечению точности и правильности определения при анализе многокомпонентных систем [8, 39, 40].

Общие принципы решения этой проблемы, сформулированные в работе [40], заключаются в следующем:

- 1 — поиск такого трансдуктора, который бы отвечал только на специфические взаимодействия;
- 2 — поиск полимерных покрытий с низкими сорбционными свойствами, но с высокой плотностью функциональных групп для иммобилизации биорецепторов, а также разработка способов нанесения таких покрытий на поверхность трансдукторов;
- 3 — создание или реконструкция подложки или мембраны, способных изменять свои характеристики (проницаемость, активность включенных ферментов, вязкость) при взаимодействии со специфическими лигандами, подобно тому, как это реализовано в мембранных рецепторных системах.

СЕЛЕКТИВНОСТЬ

Основные приемы, с помощью которых можно обеспечить повышение селективности, хорошо известны и состоят в следующем [8, 39]:

- изменение потенциала электрода, на котором фиксируется ток превращения пероксида водорода;
- использование медиаторных пар, способных к редокс-превращению при более отрицательных потенциалах;
- реализация прямого биоэлектродкатализа;
- применение биферментных мембран;
- использование мембран, обеспечивающих селективное проникновение определяемо-

го субстрата в слой иммобилизованного фермента или к индикаторному электроду.

В работах [8, 39] приведены примеры, иллюстрирующие принципиальную возможность применения всех этих способов, однако с точки зрения реального применения, наиболее простым и технологичным способом повышения селективности определения субстратов до последнего времени оставалось применение многослойных мембран [8, 41 - 43]. В последних предусмотрено применение защитных мембран, что позволяет не только повысить селективность определения, но и значительно увеличить (в 4 - 10 раз) диапазон линейного отклика сенсора. Обеспечение надежности и правильности результатов анализа за счет увеличения избирательности чувствительного слоя, достигаемое модифицированием его состава, является наиболее распространенным, но не единственным возможным способом. Улучшения аналитических характеристик можно добиться и с помощью таких нетривиальных способов, как наложение дополнительных физических полей или применение адекватного аппаратно-программного обеспечения.

В качестве примера первого подхода можно привести работу [44], в которой показано, что селективность волоконно-оптических зондов, основанных на регистрации флуоресценции или хемилюминесценции, может быть значительно улучшена путем наложения электрического потенциала вокруг окончания зонда. Возможность расширения аналитических возможностей электрохимических методов при воздействии физических полей разной природы (УЗ-, магнитного, СВЧ-полей) на систему электрод-раствор рассмотрена в работе [45].

Второй подход к решению этой проблемы заключается в обеспечении селективности аналитической системы в целом с помощью компьютерной обработки информации, полученной от набора неселективных сенсоров с разной чувствительностью к мешающим компонентам [28]. Селективность анализа при использовании неселективных сенсоров может обеспечиваться:

- 1 — решением системы уравнений, описывающих зависимость стационарного отклика сенсоров от параметров внешней среды (исследуемого раствора);
- 2 — анализом динамики отклика сенсоров;
- 3 — измерением и анализом нескольких выходных сигналов, получаемых от одного

сенсора (например, потенциала, сопротивления, емкости и т.д.).

Таким образом, при современном уровне развития микропроцессорной техники правильность, точность и надежность результатов анализа в равной степени зависят как от физико-химических свойств первичных преобразователей, так и от систем обработки сигнала.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ

Одной из самых актуальных задач, которую нужно решить при проведении медико-биологических и экологических исследований, является увеличение чувствительности методик. Для увеличения чувствительности определения с помощью биосенсоров применяют, в основном, принцип усиления специфического сигнала, позволяющий избежать сложной процедуры пробоподготовки.

Одним из способов реализации такого принципа является применение биферментных мембран, в которых усиление в 100 - 1000 раз обеспечивается за счет циклического превращения субстратов [8, 39]. Число таких систем непрерывно расширяется, однако применение их в клинической практике затруднено вследствие сложности методики определения и калибровки биосенсоров [8].

Для увеличения чувствительности определения применим метод, аналогичный электрохимическому стриппингу, — биоамперометрия с накоплением [8, 39, 46]. Измерения аналогового сигнала в этом случае проводят в импульсном режиме после предварительного накопления продуктов ферментативной реакции: при низком содержании субстрата пиковый ток превышает стационарный более, чем на порядок. Electroды этого типа созданы для определения глюкозы, ксантиана и L-лактата, причем диапазон определения первых двух метаболитов составляет 0,01 - 0,1 мм, а L-лактата — 10 - 300 нМ [39]. В то же время практического применения метод пока не нашел из-за низкой стабильности ферментных электродов, которая в этом случае, как считают авторы [8], может ухудшаться из-за субстратного ингибирования ферментов.

Еще одним из способов значительного повышения чувствительности биосенсоров — в основном, иммуносенсоров — с коэффициентом усиления $10^4 - 10^7$ является использование липосом, внутренняя водная фаза ко-

торых содержит маркеры (ионы, субстраты, ферменты) [7, 47 - 49]. Липосомы ведут себя в реакциях с комплементом также, как природные клеточные мембраны, вследствие чего стало возможным определение антигенов, антител и комплемента на основе очень простого и значительного усиления сигналов [7, 50]. Однако при разработке этих аналитических систем на первое место по трудности и временным затратам выступают вопросы препаративной техники, в том числе оптимизация условий получения и лизиса липосом [50].

В работе [40] рассмотрены молекулярные системы усиления специфического сигнала, используемые в настоящее время при создании биосенсоров, и выделены четыре принципиально различные кинетические модели реализации усиления: *ферментативное усиление, модуляция неспецифической реакции, смещение равновесия, каскадное усиление.*

НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ БИОСЕНСОРОВ

На основании имеющейся в научной литературе информации можно заключить, что в настоящее время показана и имеется принципиальная возможность оптимизации всех аналитических характеристик биосенсоров и обеспечения адекватности получаемой с их помощью информации аналитической задаче и анализируемому объекту. В то же время по-прежнему камнем преткновения являются вопросы практической реализации принципиальных решений и схем, включающие технологическое, конструктивное, аппаратно-программное и методическое обеспечение разработки и применения аналитических систем. Что же касается идеологии построения, конструктивных особенностей и аппаратного оформления аналитических систем, то для современного этапа характерно существование одновременно нескольких направлений развития:

1) Создание простых миниатюрных устройств, позволяющих проводить экспресс-анализ компонентов крови. В работе [51] дано описание такого устройства (представляющего пример приборов нового поколения), размер которого соответствует размеру авторучки, и который основан на применении специализированных полосок одноразового пользования.

- 2) Отображение получаемой при анализе информации в виде специальных символов и знаков на контрольной зоне индикаторного элемента вместо цифровой или цветовой индикации [52, 53].
- 3) Создание "интеллектуальной" аппаратуры на основе максимального использования достижений вычислительной техники и электроники, в частности, применения методов распознавания образов [54].
- 4) Разработка мультиспецифичных датчиков и систем.

Для реализации последнего направления предлагается использовать несколько вариантов решения, к числу которых, прежде всего, следует отнести многокомпонентный проточно-инжекционный анализ (ПИА) [55, 56].

Многофункциональность систем может достигаться отдельной иммобилизацией различных ферментов на стенке одного проточного реактора или применением нескольких реакторов в одной аналитической системе. Для реализации многокомпонентного ПИА в работе [56] предложено применять амперометрический сенсор, включающий набор электродов, объединенных в одной тонкослойной проточной ячейке и покрытых проницаемыми селективными пленками с различными транспортными свойствами. Различие в транспортных свойствах достигается применением покрытий разной природы, отличающихся по размеру пор (ацетат целлюлозы), заряду (Nafion, поливинилпиридин, полиэфир, сульфоновая кислота) и полярности (фосфолипиды). Для математической обработки результатов использован метод линейной регрессии.

Вторым вариантом решения, которое активно развивается во многих странах с середины 80-х годов, является применение ионоселективных полевых транзисторов (ИСПТ) [22, 28]. Новые конструкции ИСПТ с разобщенными затворами полевого транзистора позволяют совмещать несколько функциональных элементов в одном сенсоре. В работе [29] приведен пример такой разработки: на одной матрице были совмещены 4 полевых транзистора, функционирующие как мультисенсор – электрод сравнения, рН-электрод, сенсоры на глюкозу и мочевины. Аналитические характеристики полученного сенсора неудовлетворительны: время отклика при определении глюкозы и мочевины составляло 15 – 20 мин, диапазон определяе-

мых концентраций был равен 50 – 2500 мг/л.

Третьим направлением исследований, признанным самым перспективным и современным, является создание мультисенсорных систем на основе метода Ленгмюра-Блоджетт [21, 57 - 61].

Пленки Ленгмюра-Блоджетт (ЛБ) представляют собой регулярные мультимолекулярные структуры, полученные путем последовательного переноса на твердую подложку мономолекулярных слоев поверхностно-активных веществ, находящихся на поверхности водного раствора. Относительная простота нанесения пленки, содержащей заданное число монослоев, на различные твердые подложки (стекло, кварц, кремний, металлы и т.д.) позволяет модифицировать поверхность подложек, причем количество индивидуальных монослоев в пленках ЛБ может достигать нескольких сотен без нарушения их регулярной структуры. Отличительной особенностью всех пленок ЛБ по сравнению с другими известными ультратонкими пленками являются их дискретность по толщине – шаг квантования определяется длиной цепи образующих монослой молекул и составляет 2,5 – 3,4 нм [57]. Поистине безграничный перечень возможностей применения пленок ЛБ приведен в работе [57], включающей описание конкретных разработок в классической и интегральной оптике, электронном приборостроении, электронной механике, при модифицировании элементной базы вычислительной техники новых поколений, в тонкой химической технологии и фотографической технике.

Комплексные исследования пленок ЛБ очень интенсивно проводятся в Японии, ФРГ, США, Англии, Франции, Израиле [57].

Метод ЛБ уже применяют при разработке иммуносенсоров разного типа – флуоресцентных, интегрально-оптических, основанных на явлении резонанса поверхностных плазмонов, а также пьезокристаллических [60]. Можно также надеяться, что применение этого метода позволит решить часть проблем, препятствующих практическому применению биосенсоров на основе ИСПТ.

Одним из новых направлений развития физико-химии ферментов являются системы ПАВ-вода-органический растворитель [62 - 65] (ПАВ – поверхностно активные вещества). Ферменты, солюбилизированные в таких микрогетерогенных системах, оказываются включенными в водную фазу внутри обращенных мицелл, имеющих мономолекулярный слой ПАВ, ориентированный гидро-

фильной частью во внутреннюю полость мицеллы, а гидрофобной – во внешнюю среду (органический растворитель). Размер внутренней водной полости мицелл сильно зависит от степени гидратации ПАВ, а степень гидратации, в свою очередь, определяет состояние и активность воды во внутренней полости. Именно изменением физико-химических свойств воды по сравнению с обычной ("объемной") водой объясняют наблюдаемые во многих системах изменения каталитической активности и субстратной специфичности ферментов [62, 63].

Анализ имеющихся в литературе экспериментальных данных позволяет сделать вывод о возможности и необходимости применения мицеллярных ферментных систем для построения биосенсоров различного типа и, в первую очередь, на основе фотометрических методов детектирования. Идея о применении систем на основе обращенных мицелл в гомогенном иммуноанализе высказана в работе [64] и основывается на полученных экспериментальных данных о том, что активность солюбилизированных ферментов максимальна, когда радиусы белковой глобулы и внутренней полости мицелл равны. По мнению авторов [64], образование комплексов антиген-антитело, происходящее в системе обращенных мицелл, будет изменять соотношение размеров мицелл и включенных в них белковых агрегатов, что приведет к изменению активности входящих в состав агрегатов ферментов.

Естественным логическим продолжением и развитием этого направления можно считать изучение ферментативных процессов непосредственно в органических растворителях [65 - 70]. Результаты экспериментальных исследований пока немногочисленны, но тем не менее позволяют сделать вывод о целесообразности проведения биокатализа в органических средах по следующим причинам [68, 69]:

- увеличение растворимости гидрофобных соединений;
- возможность изменять каталитическую активность и специфичность ферментов;
- возможность проведения новых реакций;
- увеличение в ряде случаев стабильности биосистем;
- уменьшение риска бактериального загрязнения.

Для оптимизации таких процессов наиболее важное значение имеют правильный выбор органического растворителя, материала

подложки и количества диспергированной в системе воды, которая необходима для активирования ферментов [68]. Наиболее просто реализовать оптимальные условия при использовании водонерастворимых или плохо растворимых в воде ферментов, однако, как показано в работе [66], и в случае водорастворимых ферментов можно добиться как повышения их растворимости, так и перевода в форму, обеспечивающую сохранение активности в таких "жестких" органических растворителях как бензол, трихлорэтан, толуол и хлороформ. В работе [70] изучена стабильность некоторых белков из термофильных микроорганизмов в водно-органических системах вода-бутанол и показано, что относительная стабильность белка в водно-органической системе достаточно хорошо коррелирует с его относительной термостабильностью. Авторами [70] сделан вывод о перспективности применения именно термостабильных белков для проведения катализа в органических средах.

Косвенным доказательством возможности применения ферментсодержащих органических сред являются результаты работ [71, 72], в которых были получены потенциометрические сенсоры для определения пенициллина и мочевины с помощью иммобилизации ферментов (пенициллиназы и уреазы) на поверхности поливинилхлоридной мембраны, пластифицированной три-*n*-додециламином.

По нашему мнению возможность проведения ферментативного катализа в мицеллярных и органических средах открывает широкие возможности для разработки принципиально новых "гибридных" аналитических систем с мембранными чувствительными элементами, позволяющими совместить стадии выделения, селективного концентрирования и высокочувствительного детектирования гидрофобных органических соединений различной природы (в частности, ФОС) или металлов.

В качестве одной из тенденций развития биосенсоров следует отметить и поиск новых видов биокатализаторов. К числу последних относятся, например, клетки микроорганизмов или ткани животного и растительного происхождения, что позволяет исключить стадию очистки и выделения ферментов, повысить стабильность и активность биокаталитической системы за счет интактного окружения [38]. Кроме того, в последние годы наряду с известными ферментами животного происхождения на рынок аналитических реагентов стали поступать но-

вые, являющиеся продуктами микробиологической промышленности и отличающиеся – помимо дешевизны и большей доступности – своими свойствами [73, 74].

При построении и разработке аналитических систем на основе ферментов оптимальным является использование тонкопленочных биокатализаторов, преимуществами которых – по сравнению с традиционными методами иммобилизации – являются [75]:

- возможность включения в тонкую пленку дополнительных соединений, упрочающих структуру и предотвращающих вымывание катализатора;
- возможность использования модульной конструкции биореакторов, допускающих простую замену отработанного катализатора на свежий;
- обеспечение равномерного распределения биокатализатора в тонких пленках;
- возможность послойного нанесения нескольких биокатализаторов для проведения ступенчатых биопроцессов в одной пленке;
- возможность нанесения тонкослойных биокатализаторов на продукт – проницаемые мембраны, что обеспечивает совмещение процесса синтеза и разделения.

СПЕЦИФИКА ИССЛЕДУЕМЫХ СРЕД

Наиболее широкое распространение биосенсоры нашли в медикобиологических и экологических исследованиях. Соответственно, физико-химические свойства и состав как биожидкостей, так и проб из окружающей среды существенно разнообразны, что в свою очередь предъявляет дополнительные требования к биосенсорам и обуславливает чрезвычайную сложность их разработки. Среди значительного количества биосенсоров, разработанных за последние 20 лет, имеются лишь единичные примеры приборов, пригодных для анализа природных и сточных вод [76]. При этом максимальные сложности встречает применение, казалось бы, наиболее простых биоаналитических систем – ферментных электродов. Это объясняется, в первую очередь, спецификой анализируемых сред – природных и сточных вод: в результате различных видов хозяйственной деятельности человека и под воздействием природных факторов в поверхностные воды суши попадает от 10 до 40 тысяч различных химических соединений,

которые под влиянием комплекса физико-химических и биологических факторов образуют еще большее количество производных [77]. Методом хромато-масс-спектрометрии в поверхностных, подземных и сточных водах идентифицировано 1500 органических соединений и более 500 – в питьевой воде [78]. При этом загрязнители природной среды присутствуют в различном фазовом состоянии: в виде взвешенных веществ (в том числе нерастворенных пестицидов), суспензий, эмульсий, пен, нерастворимых остатков почв, высокомолекулярных гумусовых веществ, минеральных и органоминеральных частиц (содержащих сорбированные частицы и тяжелые металлы), мицелл, продуктов жизнедеятельности и отмирания грибов, бактерий и водорослей, растворенных солей, органических кислот, радионуклидов, поверхностно-активных веществ [77].

Второй причиной, затрудняющей разработку и применение биосенсоров в экоаналитических исследованиях, является отсутствие точных представлений о механизме взаимодействия токсичных соединений различной природы с различными классами ферментов, а также незнание тех ферментов, которые могут катализировать процессы трансформации различных соединений [79].

Основными задачами при экологическом и химическом мониторинге, для решения которых могут быть использованы биосенсоры, являются [8]:

- а) измерения концентрации растворенных органических и неорганических химических веществ;
- б) определение биологической потребности в кислороде;
- в) детектирование гербицидов и мутагенов.

В работе [80] отмечается, что в настоящее время все большее значение в решении экологических проблем приобретает мониторинг качества речных вод, которые можно условно подразделить на 3 категории:

- категория I, характеризующаяся долговременными остаточными уровнями загрязнений;
- категория II, для которой характерны долговременные изменения основных качественных параметров;
- категория III, отличающаяся кратковременными значительными загрязнениями.

Наиболее трудна для мониторинга III категория вод, поэтому для мониторинга таких вод можно считать целесообразным применение биосенсоров, способных быстро реагировать на изменение качества воды.

Что касается анализа биожидкостей, то его специфику можно продемонстрировать на следующем примере. В работе [81] показано, что анализ крови на содержание глюкозы с помощью ферментных полевых транзисторов (ФПТ) возможен только при разбавлении цельной крови в 20 раз: при таком разбавлении диапазон возможных концентраций глюкозы в исследуемой пробе составляет 0,2 – 2,0 мМ, что совпадает с диапазоном линейного отклика сенсора. Действительно, нормальные величины содержания глюкозы в цельной крови составляют 3,33 – 5,55 ммоль/л [82], а при патологических состояниях (гипергликемическая кома) уровень глюкозы в крови достигает 30 – 40 ммоль/л [83]. В то же время следует учитывать, на наш взгляд, что при некоторых коматозных состояниях наблюдается очень сильное повышение содержания в крови кетоновых тел (ацетон, ацетоуксусная, β -оксимасляная кислота) от 0,1 г/л (норма) до 0,6 – 1,95 г/л [82,83], которые могут оказывать мешающее действие, степень которого, по-видимому, должна зависеть от состава мембраны и способа иммобилизации фермента. К сожалению, возможность влияния кетоновых тел на результат определения глюкозы авторами [81] не исследована. Не обсуждается также и возможность определения глюкозы при гипогликемии, для которой характерно понижение содержания глюкозы в крови.

В заключение следует указать, что для того, чтобы биосенсоры стали стандартизованными и приоритетно используемыми, а не только потенциально возможными, они должны выдержать конкуренцию и иметь несомненные преимущества по сравнению с альтернативными – химическими, биологическими и инструментальными методами, которые могут составить серьезную конкуренцию при групповой или интегральной оценке и селективном определении отдельных компонентов различных сред.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сорочинский В.В., Курганов Б.И. Ферментные электроды // Итоги науки и техники.

- Сер. Биотехнология. 1988. Т.13. 207 с.
2. *pH-based enzyme potentiometric sensors. Part 1. Theory* /Caras S.D., Janata J., Saupe D., Schmitt K. // *Anal. Chem.* 1985. V.57, №9. P.1917-1920.
 3. *Caras S.D., Petelenz D., Janata J. pH-based enzyme potentiometric sensors. Part 2. Glucose-sensitive field effect transistor* // *Ibid.* P.1920-1923.
 4. *Caras S.D., Janata J. pH-based enzyme potentiometric sensors. Part 3. Penicillin-sensitive field effect transistor* // *Ibid.* P.1924-1925.
 5. *Tatsuma T., Watanabe T.* // *Anal. Chem.* 1992. V.64, №6. P.625-630.
 6. *Варфоломеев С.Д., Белоконова Н.А.* // *Новости науки и техники. Сер. Биотехнология. Реф. сб. Вып.12. 1990. С.2-15.*
 7. *Ивеницкий Д.М., Курочкин И.Н., Варфоломеев С.Д.* // *Журн. аналит. химии.* 1991. Т.46, №8. С.1462-1479.
 8. *Богдановская В.А., Тарасевич М.Р., Боровков В.С.* // *Итоги науки и техники. ВИНИТИ. Сер. Электрохимия. 1990. Т.31. С.167-202.*
 9. *Orr T.* // *Genet. Eng. News.* 1988. V.8, №9. P.27, 40-41. (РЖ Физ.-хим. биология и биотехнология. 1989. Реф. 6E610)
 10. *Коростылева Е.А., Холина Г.Г., Туманов А.А.* // *Химия и технол. воды.* 1992. Т.14, №8. С.573-579.
 11. *Коростылева Е.А., Туманов А.А.* Развитие методов определения фосфорорганических соединений в объектах окружающей среды с применением реагентов биологического происхождения. // *Тез. докл. конф. "Аналит. химия объектов окруж. среды"*. Ч.3. С.Пб-Сочи, 1991. С.204.
 12. *Luedi H., Garn M.B., Bataillard P., Widmer H.M.* // *J. Biotechnol.* 1990. V.14, №1. P.71-79.
 13. *Maeder G., Veuthey J.-L., Pelletier M., Haerdi W.* // *Anal. Chim. Acta.* 1990. V.231, №1. P.115-119.
 14. *Jacobi R., Goeckeritz D.* // *Pharmazie.* 1989. V.44, №10. С.678-685. (РЖ Биотехнология. 1990. Реф. 4E731)
 15. *Silk komponent in bioreactor for enzyme immobilization* // *Genet. Eng. and Biotechnol. Monit.* 1987. V.IV, №21. P.17 (РЖ Биотехнология. 1988. Реф. 11E730)
 16. *Хираи Тосихиро, Хаяси Сагао* // *Кобунси Како, Polym. Appl.* 1988. Т.37, №4. С.188-192 (РЖ Физ.-хим. биол. и биотехнол. 1988. Реф. 11E740)
 17. *Стародуб Н.Ф., Хусточка Л.Н., Лазаренко А.В. и др.* // *Журн. анал. химии.* 1990. Т.45, №7. С.1432-1440.
 18. *Лебедева Т.С., Разнянская А.А., Пшежецкий В.С. и др.* // *Там же.* С.1401-01404.
 19. *Пшежецкий А.В., Лебедева Т.С., Разнянская А.А. и др.* // *Там же.* С.1421-1425.
 20. *Dominiquez P., Tunon P., Fernandez J.M., Smyth M.R.* // *Anal. Proc.* 1989. V.26, №11. P.387-389.
 21. *Airawa M., Shinohara H., Chiba T., Matuzawa M.* // *UTT Symp.* 1988. №90. P.64-69. (РЖ Физ.-хим. биология и биотехнол. 1989. Реф. 12E1666)
 22. *Мясоедов Б.Ф., Давыдов А.В.* // *Журн. анал. химии.* 1990. Т.45, №7. С.1259-1278.
 23. *Решетилов А.Н., Егоров А.М.* // *Биосенсоры. (Итоги науки и техники. Биотехнология. Т.26) М., 1990. С.3-66.*
 24. *Никольская Е.Б., Евтюгин Е.А.* // *Журн. анал. химии.* 1992. Т.47, №4. С.1358-1377.
 25. *Потенциометрический датчик токсичности природных вод на основе иммобилизованной холинэстеразы* / Г.К. Будников, Г.А. Евтюгин, Ю.В. Рыдванский, Р.Р. Авзалова // *Тез. докл. Всес. конф. "Химические сенсоры-89"*. Л., 1989. Ч.3. С.255. (Цит. по [76])
 26. *Власов Ю.Г.* // *Журн. аналит. химии.* 1990. Т.45, №7. С.1279-1293.
 27. *Стародуб Н.Ф.* // *Биополимеры и клетка.* 1989. Т.5, №1. С.5-15 (РЖ Физ.-хим. биология и биотехнол. 1989. Реф. 5B559)
 28. *Nylander C.* // *J. Phys E: Sci. Instrum.* 1985. V.18, №9. P.736-750.
 29. *Кацубэ Торуаки* // *Био индустри.* Bio Industry. 1987. V.4, №5. P.374-379 (РЖ Физ.-хим. биология и биотехнол. 1988. Реф. 6E853)
 30. *Aizawa M.* Molecular recognition and chemical amplification of biosensors // *Chem. Sensors Proc. Int. Meet. Fukuoka, Sept. 19-22, 1983. Tokyo, Amsterdam e.a., 1983. P.683-692.*

31. *Фоменко Н.В., Подлепецкий Б.И.* // Журн. аналит. химии. 1990. Т.45, №7. С.1355-1363.
32. *Cooper J.C., Hall E.A.H.* // J. Biomed Eng. 1988. V.10, №3. P.210-219.
33. *em Stable, fast-response glucose biosensor* // Bioprocess Technol. 1988. V.10, №5. P.2 (РЖ Физ.-хим. биология и биотехнол. 1989. Реф. 3E993)
34. *Tatsuma T., Watanabe T.* // Anal. Chim. Acta. 1991. V.242, №1. P.85-89.
35. *Przybyl M., Sugier H.* // Anal. Chim. Acta. 1990. V.239, №2. P.269-276.
36. *Ю.Г. Власов, В.А. Лауринавичус, Ю.А. Тарантов и др.* // Журн. аналит. химии. 1989. Т.44, №9. С.1651-1653.
37. *Левченко М.П., Михайловский С.В., Стрелко В.В., Городынский А.В.* // Журн. аналит. химии. 1990. Т.45, №8. С.1580-1585.
38. *Коваленко В.А., Соколовский В.Д.* // Журн. аналит. химии. 1989. Т.44, №3. С.389-398.
39. *Кулис Ю.Ю., Лауринавичус В.А.* // Журн. аналит. химии. 1990. Т.45, №7. С.1294-1303.
40. *Курочкин И.Н., Попов Б.Н., Чернов С.Ф.* // Биол. мембраны. 1990. Т.7, №10. С.1068-1080.
41. *Skelly P.* Enzyme electrode membrane and method of making same // Пат. 2194843, Великобритания. МКИ С 12 N 11/02, G 01 N 27/40. Заявл. 08.09.86, Оpubл. 16.03.88 (РЖ Физ.-хим. биология и биотехнол. 1989. Реф. 12E1670П)
42. *Vadgama P.M., Churchouse S.* Enzyme electrode sensor // Заявка 2197486, Великобритания. МКИ G 01 N 27/30. Заявл. 29.10.87, Оpubл. 18.05.88 (РЖ Химия. 1990. Реф. 1Г56П)
43. *Tang L.X., Kooschaki Z.B., Vadgama P.* // Anal. Chim. Acta. 1990. V.232, №2. P.357-365.
44. *Van Dyke D.A., Cheng H.-Y.* // Anal. Chem. 1989. V.61, №6. P.633-636.
45. *Каплин А.А., Брамин В.А., Стась И.Е.* // Журн. аналит. химии. 1988. Т.43, №7. С.1157-1165.
46. *Кулис Ю.Ю., Разумас В.И.* Биоамперометрия. Вильнюс: Мокслас, 1986. 215 с. (Цит. по [42])
47. *Monroe D.* // Amer. Clin. Prod. Rev. 1986. V.5, №12. P.34-41 (РЖ Биотехнология. 1987. Реф. 8E479)
48. *Lyposome type biomimetic sensor to detect protein with high accuracy* // Techno Jap. 1987. V.20, №3. P.61-63 (РЖ Физ.-хим. биология и биотехнол. 1988. Реф. 6E856)
49. *Aizawa M., Matsumura H., Yokoyama H. e.a.* // Ое буцури. 1988. V.57, №12. С.1901-1906 (РЖ Биотехнология. 1989. Реф. 5E606)
50. *Research directions for bioanalytical sensor development* / Durst R.A., Plant A.L., Brown L.L. e.a. // Bioelectroanal. 1:1st Symp., Matrafuered, 6-8 Oct., 1986. Budapest, 1987. P.3-14.
51. *McCann J.M.* The forthcoming revolution in clinical biochemistry // World Biotech. Rept. 1987, Proc. Conf., London, May, 1987. Vol.1, Pt.2. London, 1987. P.41-50 (РЖ Биотехнология. 1988. Реф. 4E179)
52. *Усовершенствованное устройство для иммунологических тестов типа погружаемой полоски и комплект с таким устройством* // А1 №2656928, Франция. От 9.11.1990. 5G 01 №33/535; 33/52; 33/74. Приор. 10.01.90 US №00462828 (РЖ ИСМ. 1992, №9, с.73)
53. *Приспособление для иммунного анализа типа погружной полоски и комплект, содержащий такие полоски* // А1 №2656927 от 9.11.1990. 5G 01 №33/535; 33/52; 33/74. Приор. 10.01.90 US №00462827 (Там же)
54. *Diamond D.* // TrAC: Trends Anal. Chem. 1989. V.8, №2. P.58-62 (РЖ Химия. 1989. Реф. 11Г71)
55. *Укэда Хироюки* // Бунсэки. 1988. №7. С.530 (РЖ Биотехнология. 1989. Реф. 6E588)
56. *Wang J., Rayson G.D., Zting Z., Hui Wu* // Anal. Chem. 1990. V.62, №18. P.1924-1927. (РЖ Химия. 1991. Реф. 13Г106)
57. *Гевод В.С., Ксенжск О.С., Решетняк И.П.* // Биол. мембраны. 1988. Т.5, №12. С.1237-1269.
58. *Okawa Y., Watanabe T.* // Кагаку коге - Chem.Ind. (Japan). 1988. Т.39, №10. С.861-867. (РЖ Биотехнология. 1989. Реф. 7E733)
59. *Зайцев С.Ю., Калабина Н.А., Зубов В.П.* // Журн. аналит. химии. 1990. Т.45, №7. С.1452-1455.
60. *Львов Ю.М., Ерохин В.В., Зайцев С.Ю.* // Биол. мембраны. 1990. Т.7, №9. С.917-937.

61. *Tsuzuki H., Watanabe T., Okawa Y. e.a.* // Chem. Lett. 1988. №8. P.1265-1268.
62. *Моделирование структуры и функции биокаталитических белок-липидных ансамблей в системах белок-ПАВ-вода-органический растворитель / Левашов А.В., Хмельницкий Ю.Л., Клячко Н.Л., Мартинек К.* // Биологические мембраны и мембрано-активные соединения. Под. ред. Б.А. Ташмухамедова. Ташкент, 1985. С.39-68.
63. *Левашев А.В.* // Биотехнология. (Итоги науки и техники. ВИНТИ АН СССР). Т.4. М., 1987. С.112-158.
64. *Kabanov A.V., Khrutskaya M.M., Eremin S.A. e.a.* // Anal. Biochem. 1989. V.181, №1. P.145-148.
65. *Castro M.J.M., Cabral J.M.S.* // Biotechnol. Adv. 1988. V.6, №2. P.151-167.
66. *Йосимото Т., Такасаки К., Инада Ю.* // Гэндай кагаку, Chem. Today. 1987. №195. С.16-21 (РЖ Биотехнология. 1988. Реф. 6E860)
67. *Waks M.* Proteins and peptides in water - restricted environments // Proteins. 1986. V.1, №1. P.4-15.
68. *Adlercreuts P.* // Rapp. Ingenjoersvetenskap. 1988. №346. P.18-35.
69. *Zaks A., Russel A.J.* // J. Biotechnol. 1988. V.8, №4. P.259-269.
70. *Owusu R.K., Cowan D.A.* // Biochem. Soc. Trans. 1989. V.17, №3. P.581-582. (РЖ Биотехнология. 1990. Реф. 4E730)
71. *Anzai Jun-ichi, Shimada M., Fu H., Osa T.* // Chem. and Pharm. Bull. 1987. V.35, №11. P.4568-4573 (РЖ Биотехнология. 1988. Реф. 7E586)
72. *Chen Chien-Wu, Anzai Jun-ichi, Osa T.* // Chem. and Pharm. Bull. 1988. V.36., №9. P.3671-3674.
73. *Вашкевич О.В.* Ингибиторный анализ фермента *Bac. subtilis* - эстеразы I и разработка методик определения ФОС с его использованием. Дисс. канд. хим. наук. Л.: ХИМНА-ЛИТ, 1987. 179 с.
74. *Методические указания по определению фосфорорганических пестицидов в воде, почве и растительных продуктах хроматографическим методом.* №4364-87 от 08.06.1987 г. Москва.
75. *Schaeffer J.R., Burdick B.A., Abrams C.T.* // Chemtech. 1988. V.18, №9. P.546-550.
76. *Kindervater R., Schmid R.D.* // Z. Wasser-und Abwasser Forsch. 1989. Bd.22, №2. P. 84-90.
77. *Буравлев Е.П., Сточный В.С.* // Химия и технол. воды. 1993. Т.15, №7-8. С.516-522.
78. *Пилипенко А.Т., Терлецкая А.В., Зульфигаров О.С.* Концентрирование органических соединений при анализе вод // Концентрирование следов органических соединений. М.: Наука, 1990. С.191-211.
79. *Туманов А.А., Коростылева Е.А.* // Журн. аналит. химии. 1990. Т.45, №7. С.1304-1311.
80. *Future trends in river quality monitoring* // Water and Waster Treat. (Gr.Brit.) 1990. V.33, №2. P.32,34.
81. *А.П. Солдаткин, А.К. Сандровский, А.А. Шульга и др.* // Ж. аналит. химии. 1990. Т.45, №7. С.1405-1409.
82. *Комаров Ф.И., Коровкин Б.Ф., Меньшиков В.В.* Биохимические исследования в клинике. Л.: Медицина, 1981. 406 с.
83. *Руководство по клинической лабораторной диагностике / Под. ред. В.В. Меньшикова.* М.: Медицина, 1982. 576 с.