

DOI: 10.17725/rensit.2023.15.307

Биосенсор на основе пленки Ленгмюра-Блоджетт с ферментом алкогольоксидазы

Горбачев И.А., Смирнов А.В.

Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, <http://www.cplire.ru/>
Москва 125009, Российская ФедерацияE-mail: iliyagor36@gmail.com, andre-smirnov-v@yandex.ru

Поступила 08.09.2023, рецензирована 13.09.2023, принята 18.09.2023

Представлена действительным членом РАЕН В.В. Колесовым

Аннотация: Проведено изучение сенсорных свойств биопленки на основе фосфолипидных молекул 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина с иммобилизованными молекулами фермента алкогольоксидазы к парам этилового и изопропилового спиртов. Иммобилизация молекул фермента алкогольоксидазы проведена в процессе ленгмюровского монослоя фосфолипидных молекул. Получение сенсорного покрытия происходило по технологии Ленгмюра-Шеффера, при которой подложка ориентирована параллельно монослою. В ходе анализа микроизображений поверхности пленки, полученных методом атомно-силовой микроскопии, было установлено наличие молекул фермента в ней. Изучение сенсорных свойств сформированных покрытий проводилось с использованием акустоэлектронной технологии. Наличие фермента в сенсорном покрытии приводило к увеличению амплитудного и фазового откликов акустической линии задержки при взаимодействии с парами детектируемого вещества. Максимальный амплитудный и фазовый отклики были зарегистрированы при взаимодействии пленки с парами этанола и составляли 1.5 дБ и 19°, соответственно. В работе было показано, что сформированное сенсорное покрытие обладает селективной чувствительностью к парам этанола. Это позволяет сделать вывод о возможности использования данного сенсорного покрытия для создания акустоэлектронного биосенсора этанола. Увеличение чувствительности подобных биосенсоров можно достичь путем варьирования таких технологических параметров, как количество слоев в пленке, а также количество иммобилизованного фермента в каждом из слоев.

Ключевые слова: пленки Ленгмюра-Блоджетт, монослои с иммобилизованным ферментом, акустоэлектронный сенсор, биосенсор, сенсор этанола

УДК 534.22.093.3, 539.23

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда, грант № 22-29-20317.

Для цитирования: Горбачев И.А., Смирнов А.В. Биосенсор на основе пленки Ленгмюра-Блоджетт с ферментом алкогольоксидазы. РЭНСИТ: Радиоэлектроника. Наносистемы. Информационные технологии, 2023, 15(3):307-316. DOI: 10.17725/rensit.2023.15.307.

Biosensor based on Langmuir-Blodgett film with alcohol oxidase enzyme

Iliya A. Gorbachev, Andrey V. Smirnov

Kotelnikov Institute of Radioengineering and Electronics of RAS, <http://www.cplire.ru/>
Moscow 125009, Russian FederationE-mail: iliyagor36@gmail.com, andre-smirnov-v@yandex.ru

Received September 08, 2023, peer-reviewed September 13, 2023, accepted September 18, 2023

Abstract: The work examined the sensor properties of a biofilm based on phospholipid molecules 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine with immobilized molecules of the enzyme

alcohol oxidase to vapors of ethyl and isopropyl alcohols. The immobilization of alcohol oxidase enzyme molecules was carried out using a Langmuir monolayer process of phospholipid molecules. The sensor coating was obtained using the Langmuir-Schaeffer technology, in which the substrate is oriented parallel to the monolayer. The analysis of microimages of the film surface obtained by atomic force microscopy, allows to present of enzyme molecules in it was established. The study of the sensory properties of the formed coatings was carried out using acoustoelectronic technology. The presence of the enzyme in the sensor coating led to an increase in the amplitude and phase responses of the acoustic delay line when interacting with vapors of the detected substance. The maximum amplitude and phase responses were recorded when the film interacted with ethanol vapor and were 1.5 dB and 19°, respectively. The work showed that the formed sensor coating has selective sensitivity to ethanol vapor. This allows us to conclude that it is possible to use this sensor coating to create an acoustoelectronic ethanol biosensor. Increasing the sensitivity of such biosensors can be achieved by varying technological parameters such as the number of layers in the film, as well as the amount of immobilized enzyme in each layer.

Keywords: Langmuir-Blodgett films, monolayers with immobilized enzyme, acoustoelectronic sensor, biosensor, ethanol sensor

UDC 534.22.093.3, 539.23

Acknowledgments: The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation, grant No. 22-29-20317.

For citation: Iliya A. Gorbachev, Andrey V. Smirnov. Biosensor based on Langmuir-Blodgett film with alcohol oxidase enzyme. *RENSIT: Radioelectronics. Nanosystems. Information Technologies*, 2023, 15(3):307-316e. DOI: 10.17725/rensit.2023.15.307.

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ (308)
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ (309)
 - 2.1. ФОРМИРОВАНИЕ СЕНСОРНОГО ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ ПЛЕНОК ЛЕНГМЮРА-БЛОДЖЕТТ С ФЕРМЕНТОМ АЛКОГОЛЬОКСИДАЗА (309)
 - 2.2. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ СФОРМИРОВАННЫХ СЕНСОРНЫХ ПОКРЫТИЙ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ (310)
 - 2.3. ИЗУЧЕНИЕ СЕНСОРНЫХ СВОЙСТВ СФОРМИРОВАННЫХ ПОКРЫТИЙ АКУСТОЭЛЕКТРОННЫМ МЕТОДОМ (311)
 - 2.3.1. СОЗДАНИЕ АКУСТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ ЗАДЕРЖКИ (311)
 - 2.3.2. ИЗМЕРИТЕЛЬНЫЙ СТЕНА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСЕНСОРА (312)
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ (312)
 - 3.1. ВЛИЯНИЕ АДСОРБЦИИ ФЕРМЕНТА АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ НА ПОВЕРХНОСТНЫЕ СВОЙСТВА МОНОСЛОЕВ ДППЕ (312)
 - 3.2. МОРФОЛОГИЯ ПЛЕНОК ЛЕНГМЮРА-БЛОДЖЕТТ ДППЕ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ФЕРМЕНТОМ АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ (АО) (313)
 - 3.3. СЕНСОРНЫЕ СВОЙСТВА ПЛЕНОК ЛЕНГМЮРА-БЛОДЖЕТТ ДППЕ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ФЕРМЕНТОМ АЛКОГОЛЬОКСИДА (АО) (313)
4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ (314)
- ЛИТЕРАТУРА (315)

1. ВВЕДЕНИЕ

Активное развитие медицинской и химической промышленности требует создания новых эффективных систем контроля за протеканием технологических процессов. Малейшее изменение концентрации прекурсоров, химических реагентов может существенно повлиять на результат производственного процесса. Кроме того, малейшая утечка некоторых химических веществ может оказывать токсикологическое воздействие на персонал предприятия и окружающую среду. К таким веществам можно отнести предельные одноатомные спирты, обладающие широкой вариативностью воздействия на организм человека [1,2]. В связи с этим особую актуальность приобретает задача определения концентрации паров спиртов в окружающей среде.

Можно выделить два типа наиболее часто используемых датчиков для определения паров спиртов в газовой фазе. Первый это оптический тип датчиков, основанный на изменении коэффициентов поглощения и преломления изучаемой пробы. Второй тип датчиков основан на изменении электрической проводимости системы. Главным недостатком датчиков обоих типов является малая селективность и

сложность определения элементного состава смеси различных спиртов [3,4]. Проведение ферментативных реакций на сенсорном покрытии является одним из способов решения указанной проблемы [5].

Существует ряд методик, позволяющих иммобилизовать молекулы фермента в сенсорном слое [6-8]. Одним из эффективных подходов является метод Ленгмюра-Блоджетт, который позволяет сформировать высокоупорядоченную пленку молекул поверхностно-активного вещества с одновременной иммобилизацией молекул фермента в ней [9,10]. Подобные пленки можно использовать в качестве чувствительного сенсорного покрытия при изготовлении сенсоров различного типа [11]. Перспективным направлением в сенсорике является использование акустоэлектронных технологий, в основе которых лежит изменение характеристик акустической волны при взаимодействии с внешней средой.

В акустоэлектронном устройстве акустическая волна распространяется в звукопроводе, поверхность которого находится в контакте с окружающей средой. При определенном изменении газового состава в окружающей среде изменяются характеристики (амплитуда, фаза, скорость) акустической волны в звукопроводе, которые фиксируются измерительным устройством [12]. Достаточно распространенным акустоэлектронным устройством является акустическая линия задержки (АЛЗ), в которой газочувствительное сенсорное покрытие располагается на поверхности пьезоэлектрического звукопровода между электродной системой встречно-штыревых преобразователей (ВШП) [13,14]. Параметры акустической волны в линии задержки (амплитуда, частота, фаза, скорость) достаточно сильно зависят от свойств сенсорного покрытия. На этом принципе основаны практически все акустоэлектронные сенсоры. Таким образом, изменение свойств сенсорного покрытия при взаимодействии с внешней средой, например, такие как плотность, упругость, вязкость, проводимость, является основой для разработок акустоэлектронных сенсоров различного назначения.

Использование этой технологии с применением в качестве сенсорного покрытия ЛБ-пленок с иммобилизованными белками, которые биохимически селективно взаимодействуют с различными органическими и неорганическими веществами, позволяет создавать целое семейство различных ферментативных биосенсоров нового поколения [15-18].

Целью данной работы было исследование сенсорных свойств пленки фосфолипидных молекул (1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин – ДППЕ) с иммобилизованным ферментом алкогольоксидазы (АО) к парам этилового и изопропилового спирта.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 ФОРМИРОВАНИЕ СЕНСОРНОГО ПОКРЫТИЯ НА ОСНОВЕ ПЛЕНОК ЛЕНГМЮРА-БЛОДЖЕТТ С ФЕРМЕНТОМ АЛКОГОЛЬОКСИДАЗА

Для формирования пленок Ленгмюра-Блоджетт и иммобилизации в них фермента был использован раствор 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ДППЕ, 99%, Sigma Aldrich) в хлороформе (99%, Sigma Aldrich) с концентрацией 10^{-3} М/л. Формирование мультислойной пленки ДППЕ с иммобилизованным ферментом АО были выполнены на установке LB Trough Nima KSV KN2001 (Nima KSV, Финляндия) при температуре водной субфазы 22°C . В качестве субфазы был использован водный раствор молекул АО с концентрацией фермента 0.015 мг/мл.

Формирование сенсорного покрытия на основе мультислойной пленки Ленгмюра-Блоджетт фосфолипидных молекул ДППЕ с иммобилизованным ферментом происходило по следующей методике. На поверхность водной субфазы закапывалась аликвота раствора ДППЕ в хлороформе объемом 60 мкл. По прошествии 120 минут, отводимых на адсорбцию фермента на поверхности водной субфазы [19], монослой ДППЕ сжимался подвижными барьерами с постоянной скоростью убыли площади, равной $1.5 \text{ см}^2/\text{мин}$. В процессе сжатия монослоя подвижными барьерами в автоматическом режиме производилась

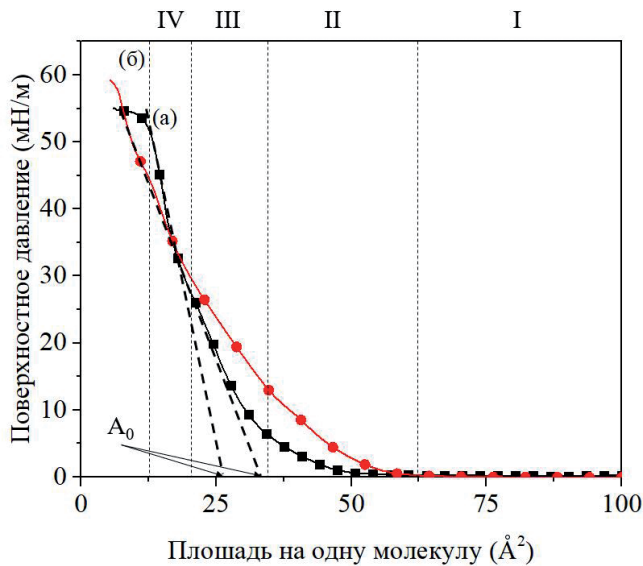


Рис. 1. Изотермы сжатия монослоя ДППЕ на субфазе в отсутствие (а) и при наличии растворенных молекул фермента АО (б), где I, II, III и IV это газовая, жидко-расширенная, жидко-конденсированная и конденсированная фазы монослоя, соответственно.

запись зависимости поверхностного давления от площади, занимаемой одной молекулой в монослое (изотерма сжатия). Изотермы сжатия монослоев ДППЕ, сформированных на поверхности водной субфазы при наличии и в отсутствие растворенных молекул АО, приведены на **Рис. 1**. Для оценки влияния адсорбции фермента АО на поверхностные свойства монослоев были использованы такие параметры как удельная площадь на одну молекулу в жидко-конденсированной фазе монослоя (A_0) и модуль сжатия монослоя (k) [20]. Величина A_0 численно равна координате точки пересечения прямой, проведенной через конденсированную фазу монослоя, и оси абсцисс. Модуль сжатия монослоя (k) определяется из следующего соотношения:

$$k = -A_0 \frac{d\pi}{dA}, \quad (1)$$

где A_0 , A , π – это удельная площадь на молекулу в наклонной конденсированной фазе монослоя, удельная площадь на молекулу и поверхностное давление, соответственно.

Перенос сформированных монослоев на твердые подложки осуществлялся по методу Ленгмюра-Шеффера (горизонтальный лифт) при величине поверхностного давления равном 40 мН/м. Для этого подложка, ориентированная

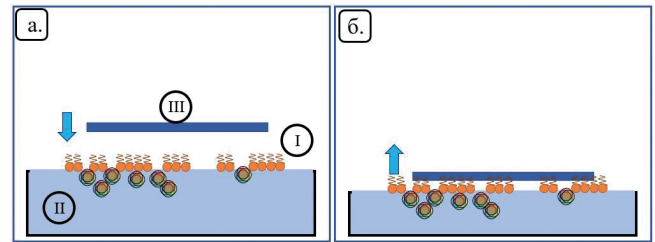


Рис. 2. Схематическое изображение процесса формирования сенсорной пленки по технологии Ленгмюра-Шеффера (а – погружение подложки, б – отрыв подложки от поверхности воды с адсорбированным монослоем), где I – монослой с иммобилизованными молекулами фермента АО, II – водная субфаза с растворенным ферментом АО, III – подложка.

параллельно монослою, была приведена в контакт с поверхностью воды, при этом монослой адсорбировался на поверхности подложки. После высушивания сформированной пленки в течении 10 минут происходил повторный процесс переноса монослоя. Таким образом была сформирована шестислойная пленка с иммобилизованными молекулами фермента. В качестве подложки были использованы пластины ниобата лития и атомарно-гладкие пластины слюды. Схематически процесс переноса ленгмюровского монослоя на твердую подложку приведен на **Рис. 2**.

Сушка сенсорных покрытий осуществлялась в течении 2 часов в эксикаторе. Так как чувствительная пленка формировалась на всей поверхности пластины, то после высыхания ЛБ-пленки электродные структуры акустической линии задержки механически очищались с использованием хлороформа (99% Sigma Aldrich) и этилового спирта (95% Sigma Aldrich). В результате сформированное покрытие локализовалось в пространстве между преобразователями и не оказывало влияния на процесс возбуждения и регистрации акустической волны.

2.2. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ СФОРМИРОВАННЫХ СЕНСОРНЫХ ПОКРЫТИЙ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Морфология пленок ДППЕ с иммобилизованным ферментом АО, перенесенных на подложки из слюды, была изучена методом атомно-силовой микроскопии на установке NT-MDT Solver (Россия, Зеленоград, NT-MDT). Сканирование

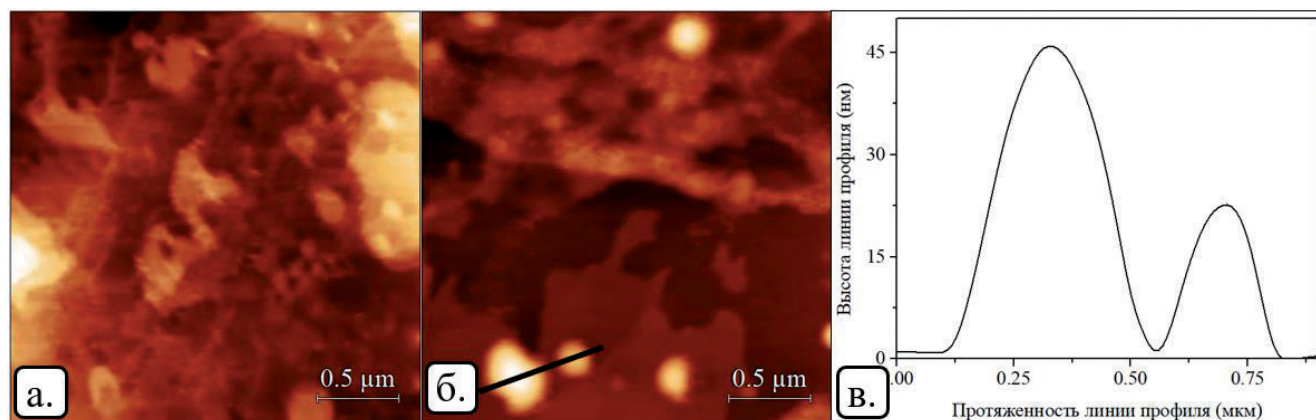


Рис. 3. Изображения поверхности пленки ДППЕ, сформированной в отсутствии (а) и при наличии (б) растворенных в субфазе молекул фермента АО, и линия профиля поверхности пленки с включенными агрегатами молекул фермента (в).

осуществлялось в прерывисто-контактном режиме с частотой 1 Гц. Для сканирования были использованы зонды NSG10 (NT-MDT, Россия) с радиусом закругления острия зонда 10 нм. Изображения поверхности, полученные при изучении пленок, приведены на **Рис. 3**.

Для количественной оценки свойств поверхности пленки в работе была рассчитана величина средней шероховатости пленки (R_a). Расчет выполнялся в автоматическом режиме с использованием программного обеспечения Gwyddion 2.62 [21,22].

2.3 ИЗУЧЕНИЕ СЕНСОРНЫХ СВОЙСТВ СФОРМИРОВАННЫХ ПОКРЫТИЙ АКУСТОЭЛЕКТРОННЫМ МЕТОДОМ

2.3.1. СОЗДАНИЕ АКУСТИЧЕСКОЙ ЛИНИИ ЗАДЕРЖКИ

Акустическая линия задержки формировалась на пьезоэлектрической подложке из ниобата

лития 128YX, размерами 25×15 мм, толщиной 2 мм. Электродные структуры в виде встречно-штыревых преобразователей (ВШП) изготавливались методами безмасочной фотолитографии и магнетронного напыления алюминия. На **Рис. 4а** представлено оптическое изображение сформированных электродных структур акустоэлектронной линии задержки, полученное с помощью лазерного конфокального сканирующего микроскопа OlympusLext. Апертура преобразователей $A = 9$ мм, расстояние между преобразователями $L = 10$ мм. Рабочая длина волны определяется расстоянием между соседними электродами ВШП и составляла 200 мкм. Каждый встречно штыревой преобразователь содержал 20 пар штыревых электродов. На **Рис. 4б** представлено схематическое изображение области расположения чувствительного покрытия на поверхности линии задержки.

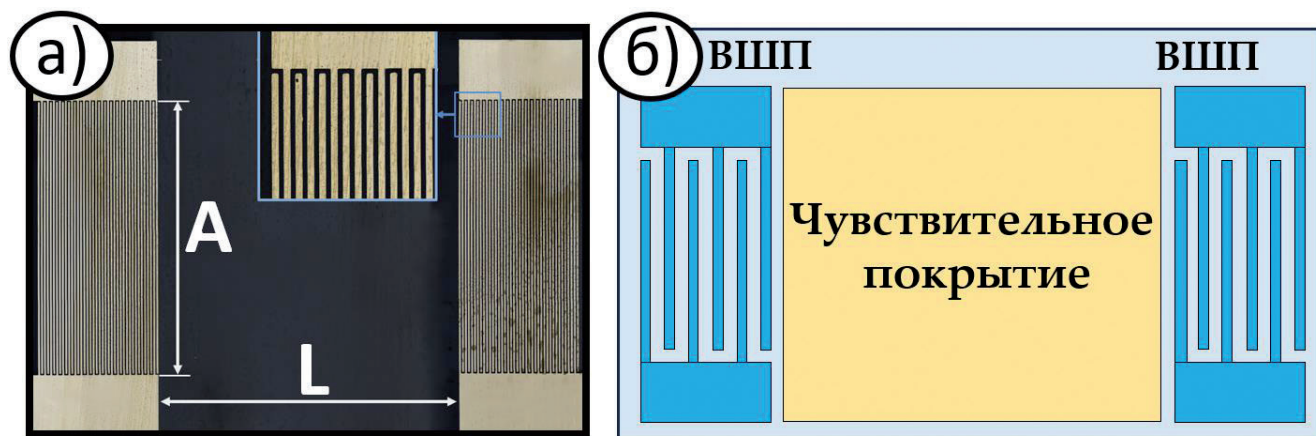


Рис. 4. Оптическое изображение электродных структур созданной линии задержки (а), схематическое изображение расположения чувствительного сенсорного покрытия на поверхности ЛЗ.

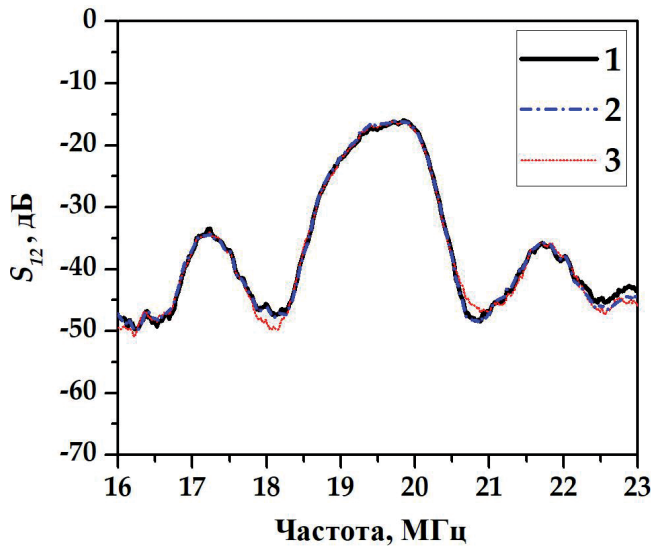


Рис. 5. Частотные зависимости S_{12} -параметров линии задержки в отсутствие покрытия (1), при сформированном покрытии DPPE (2) и покрытии DPPE+фермент (3).

На **Рис. 5** представлены амплитудно-частотные зависимости S_{12} -параметров акустической линии задержки в отсутствие покрытия, при сформированном покрытии DPPE и покрытии DPPE+фермент.

Из графиков видно, что покрытие не оказывает существенного влияния на вид и уровень акустического сигнала.

2.3.2. ИЗМЕРИТЕЛЬНЫЙ СТЕНД ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОСЕНСОРА

Изучение газочувствительных свойств сформированных покрытий осуществлялось с помощью автоматизированного измерительного комплекса. Схематическое изображение предоставлено на **Рис. 6**. Поток чистого осушенного воздуха от генератора чистого

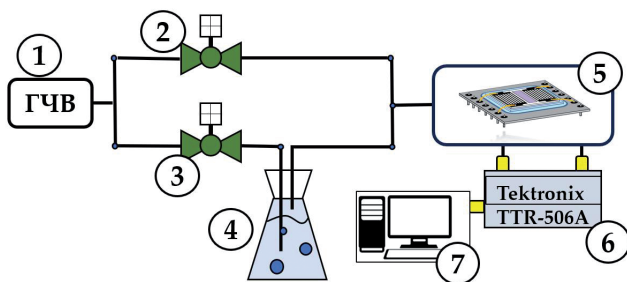


Рис. 6. Схематическое изображение измерительного стенда: (1) генератор чистого воздуха, (2) расходомер сухого воздуха, (3) расходомер сухого воздуха для подачи в барботер (4), измерительная камера (5), векторный анализатор цепей (6) и персональный компьютер (7).

воздуха (1), по магистралям из нержавеющей стали подается к расходомерам (2) и (3), расходомер (2) регулирует поток сухого воздуха, используемый для продувки измерительной камеры и разбавления потока тестовой газовой смеси. Расходомер (3) регулирует поток сухого воздуха, подаваемый в аэратор (размер пор 20 мкм) барботера (4). При барботировании сухой воздух насыщается парами тестируемой жидкости (пропанол и этанол) и на выходе барботера получают смесь сухого воздуха и паров тестируемого вещества при концентрации близкой к насыщенной. Регулировка соотношения потоков газа, проходящих через расходомеры (2) и (3), позволяла подавать в измерительную камеру (5) газовую смесь с нужной концентрацией тестируемого вещества. С помощью векторного анализатора цепей Tektronix TTR-506A и персонального компьютера фиксировались изменения акустического сигнала при воздействии разной концентрации тестируемых веществ.

Подробная информация по измерительному стенду представлена в работах [15,23].

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ВЛИЯНИЕ АДСОРБЦИИ ФЕРМЕНТА

АЛКОГОЛЬОКСИДАЗЫ НА ПОВЕРХНОСТНЫЕ СВОЙСТВА МОНОСЛОЕВ ДППЕ

На **Рис. 1** приведены изотермы сжатия монослоев ДППЕ, сформированные на субфазе в отсутствие и при наличии растворенного фермента АО. В отсутствие растворенных в субфазе молекул фермента АО фосфолипидные молекулы ДППЕ формируют стабильный монослой. На изотерме сжатия можно выделить газовую, жидко-расширенную (II), жидко-конденсированную (III) и конденсированную фазы (IV). В конденсированной фазе величины A_0 и k принимают значения 25.2 \AA^2 и 106.68 мН/м , соответственно. Добавление в субфазу молекул растворенного фермента АО оказывает влияние на поверхностные свойства монослоя ДППЕ, так A_0 увеличивается до 35.7 \AA^2 , а k уменьшается до 68.5 мН/м . Происходит смещение изотермы сжатия в сторону больших площадей, занимаемых одной молекулой. Данный эффект объясняется встраиванием молекул фермента АО в лентмгоровский

монослой ДППЕ. При наличии растворенных в субфазе молекул АО фазовый переход газовая фаза-жидко-расширенная фаза происходит при больших значениях площадей на одну молекулу. Этот эффект связан с адсорбцией молекул АО на поверхности воды, что приводит к увеличению общего числа молекул, находящихся на ней [19]. Уменьшение k и увеличение A_0 показывает, что адсорбция молекул АО оказывает расширяющее воздействие на структуру монослоя ДППЕ.

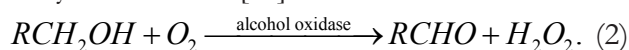
3.2 Морфология пленок Ленгмюра-Блоджетт ДППЕ с иммобилизованным ферментом алкогольоксидазы (АО)

На Рис. 3 приведены изображения поверхности пленки ДППЕ, сформированной в отсутствие и при наличии растворенных в субфазе молекул фермента АО, полученные при ее исследовании методом атомно-силовой микроскопии. Мультислойные пленки Ленгмюра-Блоджетт обладают развитой морфологией. Это связано с формированием пор в пленке при испарении воды, захваченной в процессе переноса монослоев [15] на твердую подложку. Из Рис. 3а видно, что 6-ти слойная пленка ДППЕ, сформированная на субфазе в отсутствие растворенных молекул АО, обладает развитой поверхностью с величиной средней шероховатости порядка 3 нм. Шероховатость поверхности шестислойной пленки ДППЕ с иммобилизованными молекулами фермента АО составляет величину порядка 5 нм. На поверхности пленки видны отдельные агрегаты молекул фермента АО с высотами от 15 до 40 нм и занимаемыми площадями порядка 0.2 мкм². Минимальные высоты наблюдаемых агрегатов

составляют величины, соотносимые с размерами молекулы АО, составляющими 10 нм×10 нм×10.5 нм [24]. Наличие адсорбированных агрегатов молекул фермента АО приводит к структурным перестроениям в пленке, что приводит к увеличению шероховатости поверхности пленки.

3.3 Сенсорные свойства пленок Ленгмюра-Блоджетт ДППЕ с иммобилизованным ферментом алкогольоксидазы (АО)

Фермент алкогольоксидазы катализирует окисление короткоцепочечных алифатических спиртов до соответствующих им альдегидов по следующей схеме [25]:



В ходе реакции (2) происходит изменение проводимости в области локализации фермента АО. В исследуемых образцах весь фермент локализован в ЛБ-слое толщиной до 15 нм и изменение его проводимости будет оказывать влияние на электрические свойства зондирующей его акустической волны. На Рис. 7 приведены концентрационные зависимости изменения амплитуды акустической волны (ΔS_{12}) в акустической линии задержки на частоте 19.7 МГц при взаимодействии воздушной смеси, содержащей различные концентрации паров этанола или пропанола, со сформированными сенсорными покрытиями.

Затухание акустической волны в акустической ЛЗ без и с нанесенным покрытием, не содержащим иммобилизованные молекулы фермента АО, при взаимодействии с парами этанола и пропанола составляет 0.15 дБ. Наличие молекул иммобилизованного фермента АО в

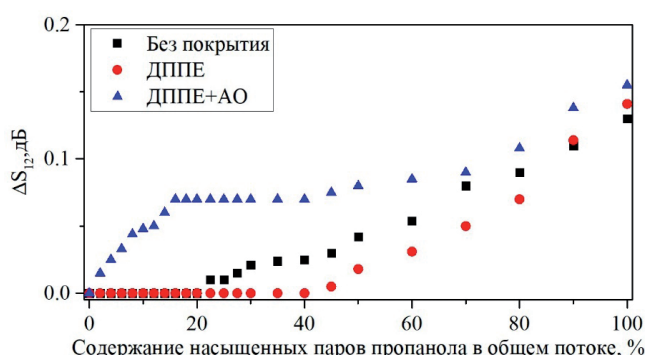
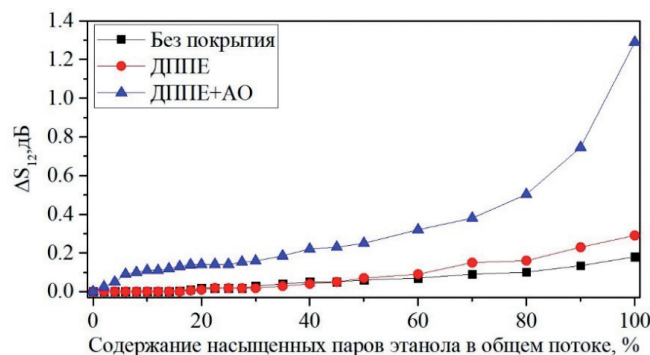


Рис. 7. Концентрационные зависимости изменения амплитуды акустической волны в акустической линии задержки на частоте 19.7 МГц для паров этанола и пропанола для чистой ЛЗ, ЛЗ с нанесенной пленкой ДППЕ и ЛЗ с нанесенной пленкой ДППЕ с иммобилизованным ферментом АО.

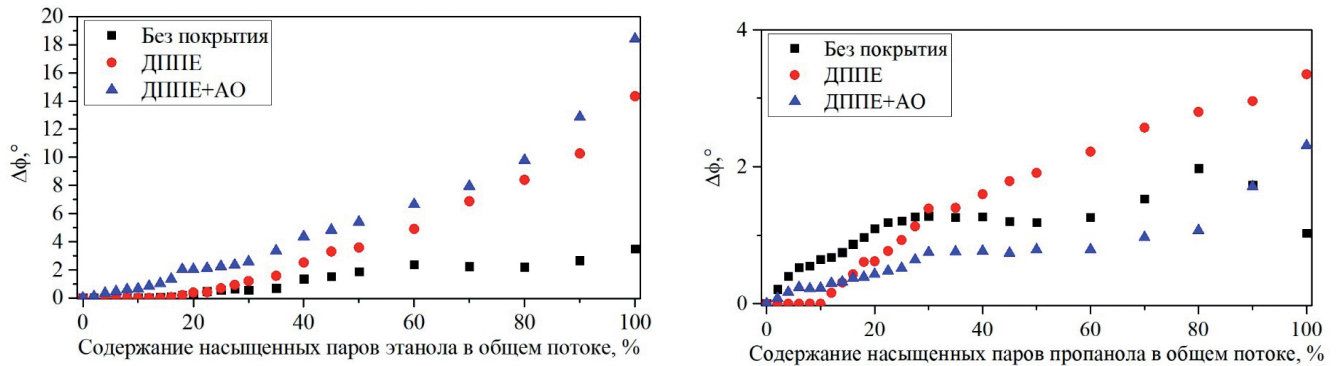


Рис. 8. Концентрационные зависимости изменения фазы акустической волны в акустической линии задержки на частоте 19.7 МГц для паров этанола и пропанола для чистой ЛЗ, ЛЗ с нанесенной пленкой ДППЕ и ЛЗ с нанесенной пленкой ДППЕ с иммобилизованным ферментом АО.

пленочном покрытии приводит к увеличению затухания акустической волны с 0.2 дБ до 1.3 дБ при 100% содержании паров этанола в потоке пробы. Затухание акустической волны в акустической ЛЗ с нанесенным пленочным покрытием с иммобилизованным ферментом АО при взаимодействии с парами пропанола составляет также 0.15 дБ.

На **Рис. 8** приведены концентрационные зависимости изменения фазы акустической волны в акустической линии задержки на частоте 19.7 МГц для паров этанола и пропанола для чистой ЛЗ, ЛЗ с нанесенной пленкой ДППЕ и ЛЗ с нанесенной пленкой ДППЕ с иммобилизованным ферментом АО. Воздействие паров пропанола на ЛЗ с нанесенным сенсорным покрытием без фермента и с ферментом приводит к фазовому сдвигу акустической волны в 2° и 3° , соответственно. Таким образом, у сформированного сенсорного покрытия практически отсутствует фазовая чувствительность к парам пропанола.

Воздействие паров этанола на ЛЗ без пленочного покрытия приводит к изменению фазы акустической волны на 3° . Наличие на поверхности ЛЗ пленочного покрытия без и с иммобилизованным ферментом приводит к увеличению максимального фазового сдвига до 14° и 19° , соответственно. При этом в диапазоне концентраций паров этанола в общем потоке пробы от 0 до 20% наличие пленки ДППЕ с иммобилизованным ферментом приводит к увеличению фазового отклика до 2° . Таким образом, показано, что сформированное сенсорное покрытие обладает селективной

чувствительностью к парам этанола. Селективность сформированного сенсорного покрытия основана на отличиях в каталитической активности используемого фермента АО по отношению к использованным спиртам [26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе была изучена морфология и сенсорные свойства пленок Ленгмюра-Блоджетт фосфолипидных молекул ДППЕ с иммобилизованными молекулами фермента АО к парам этилового и изопропилового спиртов. Методом атомно-силовой микроскопии было показано наличие фермента АО в сформированных пленочных покрытиях. В ходе исследования газочувствительности сформированных сенсорных покрытий показано, что наибольшим сенсорным откликом ЛБ-пленки обладают к парам этилового спирта. Так, максимальное изменение амплитуды и фазы акустической волны в акустической линии задержки в присутствии паров этанола составило 1.5 дБ и 19° , соответственно. При этом в области концентраций этанола в потоке пробы от 10 до 70% амплитудный отклик имеет характер близкий к линейному.

Это позволяет сделать вывод о возможности использования данного сенсорного покрытия для создания акустоэлектронного биосенсора этанола. Увеличение чувствительности подобных биосенсоров можно достичь путем варьирования таких технологических параметров, как количество слоев в пленке, а также количеством иммобилизованного фермента в каждом из слоев.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ernstgard L, Shibata E, Johanson G. Uptake and Disposition of Inhaled Methanol Vapor in Humans. *Toxicological Sciences*, 2005, 88(1):30-38.
2. Kim Y-S, Park K-Y, Cho E-S. Thirteen-week inhalation toxicity study of 1-propanol in F344 rats. *Toxicology Reports*, 2021, 8:1839-1845.
3. Fong JK, Dansby-Sparks RN, Lamb AC, Owen TW, Mushfiq M, Sampathkumaran U, Goswami K, Jensen SL, Xue ZL. Fluorescent-Dye Doped Thin-Film Sensors for the Detection of Alcohol Vapors. *Am. J. Anal. Chem.*, 2014, 5(9):566-580.
4. Dalstein O, Tabo M, Alvarez E, Roux L, Garuz R, Pasquinelli M, Azzi L, Bendahan M, Aguir K, Loizillon J, Abbarchi M, Grosso D. Method to detect ethanol vapour in high humidity by direct reflection on a xerogel coating. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2019, 11(4):4439-4446.
5. Капин ВВ, Колесов ВВ, Крупенин СВ, Паршинцев АА, Решетиллов АН, Солдатов ЕС, Азев ВН. Молекулярный нанобиосенсор на основе фермента глюкозооксидазы. *РЭНСИТ: Радиоэлектроника. Наносистемы. Информационные технологии*, 2013, 5(2):45-61.
6. Решетиллов АН, Китова АЕ, Тарасов СЕ, Плеханова ЮВ, Быков АГ, Сандраморти АК, Кузнецова ИЕ, Колесов ВВ, Готовцев ПМ. Высокоточный полимер ПЭДОТ:ПСС – применение в биомедицинских и биоэлектрохимических системах. *РЭНСИТ: Радиоэлектроника. Наносистемы. Информационные технологии*, 2020, 12(4):471-482. DOI: 10.17725/rensit.2020.12.471.
7. Abolpour A, Sariri HR, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization: an update. *J Chem Biol*, 2013, 6:185-205.
8. Nguyena NH, Kim M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Appl. Sci. Converg. Technol.*, 2017, 26(6):157-163.
9. Li J, Rosilio V, Boissonnade M-M, Baszkin A. Adsorption of glucose oxidase into lipid monolayers: effect of a lipid headgroup charge. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2003, 29:13-20.
10. Ohnuki H, Saiki T, Kusakari A, Endo H, Ichihara M, Izumi M. Incorporation of Glucose Oxidase into Langmuir-Blodgett Films. *Langmuir*, 2007, 23(8):4675-81.
11. Bie J, Sepodes B, Fernandes PCB, Ribeiro MHL. Enzyme Immobilization and Co-Immobilization: Main Framework. *Advances and Some Applications Processes*, 2022, 10:494
12. Vellekoop MJ. Acoustic wave sensors and their technology. *Ultrasonics*, 1998, 36:7-14.
13. Jahanshahi P, Wei Q, Jie Z, Zalnezhad E. Three-dimensional analysis of surface acoustic resonator for ultra-high sensitive ethanol disclosure as non-invasive biosensor. *MOJ App Bio Biomech.*, 2017, 1(4):150-151.
14. Guz L. Technical aspects of SAW gas sensors application in environmental measurements. *MATEC Web of Conferences*, 2019, 252:06007.
15. Gorbachev I, Smirnov A, Ivanov G, Avramov I, Datsuk E, Venelinov T, Bogdanova E, Anisimkin V, Kolesov V, Kuznetsova I. Langmuir-Blodgett Films of Arachidic and Stearic Acids as Sensitive Coatings for Chloroform HF SAW Sensors. *Sensors*, 2023, 23:100.
16. Ivanov GR, Avramov I. Langmuir-Blodgett Films from Fluorescently Labelled Phospholipids Deposited on Surface Acoustic Wave Devices. *Journal of Physics: Conference Series*, 2019, 1186(1):012007.
17. Gorbachev I, Smirnov A, Ivanov GR, Venelinov T, Amova A, Datsuk E, Anisimkin V, Kuznetsova I, Kolesov V. Langmuir-Blodgett Films with Immobilized Glucose Oxidase Enzyme Molecules for Acoustic Glucose Sensor Application. *Sensors*, 2023, 23:5290.
18. Giffney TJ, Ng YH, Aw KC. A Surface Acoustic Wave Ethanol Sensor with Zinc Oxide Nanorods. *Smart Materials Research*, 2011, 2012:5.
19. Caseli L, Perinotto AC, Viitala T, Zucolotto V, Jr Oliveira ON. Immobilization of Alcohol Dehydrogenase in Phospholipid Langmuir-Blodgett Films to Detect Ethanol. *Langmuir*, 2009, 25:3057-3061.
20. Vollhardt D, Fainerman VB. Progress in characterization of Langmuir monolayers by consideration of compressibility. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2006, 127:83-97.
21. Necas D, Klapetek P, Valtr M. Estimation of roughness measurement bias originating from background subtraction. *Measurement Science and Technology*, 2020, 31:094010. DOI: 10.1088/1361-6501/ab8993.
22. Necas D, Valtr M, Klapetek P. How levelling and scan line corrections ruin roughness

- measurement and how to prevent it. *Scientific Reports*, 2020, 10:15294.
23. Smirnov A, Anisimkin V, Krasnopolskaya L, Gulyi O, Sinev I, Simakov V, Golyskin A, Almyasheva N, Ageykin N, Kuznetsova I. Features of the formation of sensitive films based on mycelium of higher fungi for surface and plate acoustic waves gas sensors. *Sensors*, 2023, 23(4):2216.
24. Vonck J, Parcej DN, Mills DJ. Structure of Alcohol Oxidase from *Pichia pastoris* by Cryo-Electron Microscopy. *PLoS ONE*, 11(7):e0159476.
25. Мизгунова УМ, Тескер АЕ, Краснослободцева ЕА, Долманова ИФ. Ферментативное определение примесей метанола в водно-этанольных растворах с применением алкогольоксидазы. *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2, Химия*, 1998, 39(6):378-382.
26. Zakhari S. Overview: How Is Alcohol Metabolized by the Body? *Alcohol Research & Health*, 2006, 29(4):245-254.

Горбачев Илья Алексеевич

к.х.н.

ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН

Москва 125009, Россия

E-mail: iliyagor36@gmail.com

Смирнов Андрей Владимирович

к.ф.-м.н.

ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН

Москва 125009, Россия

E-mail: andre-smirnov-v@yandex.ru