

DOI: 10.17725/rensit.2024.16.111

Сенсорное покрытие на основе липидного ленгмюровского монослоя с молекулами фермента глюкозооксидазы

Горбачев И.А., Колесов В.В.

Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, <http://www.cplire.ru/>

Москва 125009, Российская Федерация

E-mail: iliyagor36@gmail.com, kvv@cplire.ru

Поступила 01.12.2023, рецензирована 12.12.2023, принята 13.12.2023, опубликована 15.03.2024.

Аннотация: Создано сенсорное покрытие на основе ленгмюровского монослоя фосфолипидных молекул 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DPPE) с иммобилизованными молекулами фермента глюкозооксидазы и исследованы его сенсорные свойства. Методом изотерм сжатия исследован процесс встраивания молекул фермента глюкозооксидазы в ленгмюровский монослой фосфолипидных молекул DPPE. Показано, что адсорбция молекул глюкозооксидазы оказывает расширяющее действие на ленгмюровский монослой DPPE и приводит к увеличению площади на одну молекулу с 32.5 \AA^2 до 49 \AA^2 и уменьшению модуля сжатия монослоя с 133 мН/м до 83 мН/м . Также адсорбция глюкозооксидазы приводит к увеличению коэффициента десорбции монослоя в субфазу k_d с $0.5 \cdot 10^{-3}$ до $1.2 \cdot 10^{-3}$. Методом атомно-силовой микроскопии охарактеризована морфология пленок с иммобилизованными молекулами фермента при различном времени его адсорбции. Увеличение времени адсорбции фермента приводит к уменьшению шероховатости поверхности формируемой пленки с 3.6 нм при 5 минутах до 2.4 нм при 60 минутах . Сформированные монослои DPPE с иммобилизованными молекулами фермента были перенесены на графитовые электроды. Методами циклической вольтамперометрии и импедансометрии изучены их сенсорные свойства. Полученные покрытия обладали чувствительностью к глюкозе в растворах с концентрацией от 0 до 1 мг/мл . Наличие линейной зависимости тока через измерительную ячейку в указанном диапазоне концентраций глюкозы делает созданные пленки перспективными для использования в качестве сенсорных покрытий.

Ключевые слова: амперометрический сенсор глюкозы, ферментативные сенсоры, пленки Ленгмюра-Блоджетт, биосенсоры

УДК 539.23, 544.032.7

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

Для цитирования: Горбачев И.А., Колесов В.В. Сенсорное покрытие на основе липидного ленгмюровского монослоя с молекулами фермента глюкозооксидазы. РЭНСИТ: Радиозлектроника. Наносистемы. Информационные технологии, 2024, 16(1):111-120. DOI: 10.17725/rensit.2024.16.111.

Sensor coating based on a lipid Langmuir monolayer with the glucose oxidase enzyme molecules

Iliya A. Gorbachev, Vladimir V. Kolesov

Kotel'nikov Institute of Radioengineering and Electronics of RAS, <http://www.cplire.ru/>

Moscow 125009, Russian Federation

E-mail: iliyagor36@gmail.com, kvv@cplire.ru

Received December 01, 2023, peer-reviewed December 12, 2023, accepted December 13, 2023, published March 15, 2024.

Abstract: A sensor coating was created based on a Langmuir monolayer of 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE) with immobilized molecules of the enzyme glucose oxidase and its sensor properties were studied. The process of incorporation of glucose oxidase enzyme

molecules into a Langmuir monolayer of phospholipid DPPE molecules was studied using the compression isotherm method. Adsorption of glucose oxidase molecules has an expanding effect on the Langmuir monolayer of DPPE and leads to an increase in the area per molecule from 32.5 \AA^2 to 49 \AA^2 and a decrease in the compression modulus of the monolayer from 133 mN/m to 83 mN/m . Also, the adsorption of glucose oxidase leads to an increase in the desorption coefficient of the monolayer into the k_d subphase from $0.5 \cdot 10^{-3}$ to $1.2 \cdot 10^{-3}$. The morphology of films with immobilized enzyme molecules at different adsorption times was characterized by atomic force microscopy. Increasing the enzyme adsorption time leads to a decrease in the surface roughness of the formed film from 3.6 nm at 5 minutes to 2.4 nm at 60 minutes. The formed DPPE monolayers with immobilized enzyme molecules were transferred to graphite electrodes. Their sensory properties were studied using cyclic voltammetry and impedance measurements. The resulting coatings were sensitive to glucose in solutions with concentrations from 0 to 1 mg/ml . The presence of a linear concentration dependence of the maximum and minimum currents and resistances in the specified concentration range makes the created films promising for use as touch coatings.

Keywords: amperometric glucose sensor, enzymatic sensors, Langmuir-Blodgett film, biosensors

UDC 534.22.093.3, 539.23

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

For citation: Iliya A. Gorbachev, Vladimir V. Kolesov. Sensor coating based on lipid Langmuir monolayer with the glucose oxidase enzyme molecules. *RENSIT: Radioelectronics. Nanosystems. Information Technologies*, 2024, 16(1):111-120e. DOI: 10.17725/j.rensit.2024.16.111.

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ (112)
 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ (113)
 - 2.1. ФОРМИРОВАНИЕ ЛЕНГМЮРОВСКИХ МОНОСЛОЕВ (113)
 - 2.2. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ ПОВЕРХНОСТИ ПЛЕНОК (114)
 - 2.3. ИЗУЧЕНИЕ СЕНСОРНЫХ СВОЙСТВ ПЛЕНОК ЛЕНГМЮРА-БЛОДЖЕТТ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ФЕРМЕНТОМ ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ (114)
 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ (114)
 - 3.1. ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА АДсорбЦИИ МОЛЕКУЛ ГЛЮКОЗОоксиДАЗЫ (114)
 - 3.2. Влияние времени адсорбции фермента на морфологию поверхности сформированных пленок (116)
 - 3.3. ИЗУЧЕНИЕ СЕНСОРНЫХ СВОЙСТВ СФОРМИРОВАННЫХ ПОКРЫТИЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМИ, ИМПЕДАНСОМЕТРИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ (117)
 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ (118)
- ЛИТЕРАТУРА (119)

1. ВВЕДЕНИЕ

Полисахариды, и в частности, глюкоза активно применяется в пищевой промышленности,

поэтому создание сенсоров глюкозы с повышенными показателями чувствительности и селективности является достаточно актуальной задачей для контролирования содержания ее в технологических процессах, в конечной продукции, а также в отходах производства. Перспективным решением указанной задачи является разработка сенсорного покрытия биосенсора на основе молекул фермента глюкозооксидазы (ГО).

Главной задачей при этом является закрепление молекулы фермента в сенсорном слое и сохранение ее активности на протяжении длительного периода времени. Одним из подходов, позволяющих, в рамках одной технологической операции, сформировать пленку с встроенными в нее молекулами фермента и обеспечить ее защиту от воздействия окружающей среды, является технология Ленгмюра-Блоджетт [1-4]. Ее использование позволяет сформировать бислойную мембраноподобную пленку с встроенными молекулами фермента. В такой пленке молекулы фермента будут защищены от внешнего воздействия тонким гидрофобным слоем липидных молекул. Таким образом, исследование механизма встраивания молекул

фермента в ленгмюровские монослои различных поверхностно-активных веществ (ПАВ) является важной технологической задачей [5-8]. Подобный подход также может использоваться для допирования монослоев и пленок Ленгмюра-Блоджетт ионами металлов, растворенными в субфазе [9].

Авторами [10] изучалось влияние заряда головной группы молекул ПАВ на процесс встраивания молекул фермента в липидный монослой, при этом не было учтено влияния кислотности субфазы на заряд молекулы фермента. В работе [11] изучено влияние длины гидрофобной части молекулы липида на процесс адсорбции фермента. Также в работе изучалось время адсорбции молекул глюконооксидазы на поверхности воды до начала сжатия на фазовые переходы в монослое и его поверхностные свойства. Изучение влияния времени адсорбции на свойства ленгмюровских монослоев является актуальной задачей, поскольку для изготовления воспроизводимых образцов сенсорных покрытий необходимо точно контролировать количество адсорбированных пленкой молекул фермента. В работе [12] изучалась стабильность монослоев дипальмитоилфосфатной кислоты. Авторы большее внимание уделили поверхностным свойствам монослоев при адсорбции фермента и не акцентировали внимания на изменении морфологии пленок.

Стоит отметить работы, в которых изучался процесс адсорбции глюконооксидазы смешанными монослоями фосфолипидных молекул и наночастиц [13]. Также в этой работе было изучено влияние толщины пленок с иммобилизованным ферментом на чувствительность сенсоров на их основе. Показано, что при толщинах пленки до 10-11 нм концентрационная зависимость параметров сенсоров сохраняет линейность в больших диапазонах концентраций. В то же время, недостаточно информации о стабильности монослоев на поверхности водной субфазы. Этот аспект приобретает особую актуальность при попытке массового производства сенсорных покрытий с использованием технологии Ленгмюра-Блоджетт.

Поэтому в настоящей работе были изучены сенсорные свойства покрытия

на основе сформированного липидного ленгмюровского монослоя с молекулами фермента глюконооксидазы. Для этого методом изотерм сжатия была исследована стабильность монослоев 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин в процессе адсорбции молекул глюконооксидазы и изучена морфология пленок, содержащих два типа молекул.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. ФОРМИРОВАНИЕ ЛЕНГМЮРОВСКИХ МОНОСЛОЕВ

Для приготовления раствора 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (DPPE, Sigma Aldrich, 99%) порошок DPPE растворяли в хлороформе (Sigma Aldrich, 99%), в результате чего получили раствор с концентрацией 10^{-3} М.

Все эксперименты по формированию и исследованию поверхностных свойств ленгмюровских монослоев DPPE проводились на установке KSV Nima LB Trough KN2001 (Финляндия) с площадью рабочей зоны 243 см². Формирование ленгмюровских монослоев с иммобилизованными молекулами фермента глюконооксидазы проводилось по следующей методике. На поверхность водной субфазы наносили раствор DPPE в хлороформе объемом аликвоты 50 мкл. В качестве субфазы была использована деионизованная вода с удельным сопротивлением 18 МОм×см и раствор глюкозы с концентрацией 0.015 мг/мл. По прошествии 30 минут монослой сжимали подвижными барьерами с постоянной скоростью убыли площади монослоя, равной 0.7 см²/мин. В процессе сжатия монослоя подвижными барьерами в автоматическом режиме происходила запись $\pi(A)$ изотермы – зависимости изменения величины поверхностного давления (π) от площади, занимаемой одной молекулой в монослое (A). Изотермы сжатия монослоев DPPE, сформированных в отсутствие и при наличии в субфазе растворенных молекул ГО, приведены на **Рис. 1**.

В ходе анализа изотерм сжатия были получены такие параметры монослоев, как удельная площадь на молекулу в ненаклонно-конденсированной фазе (A_0) и модуль сжатия

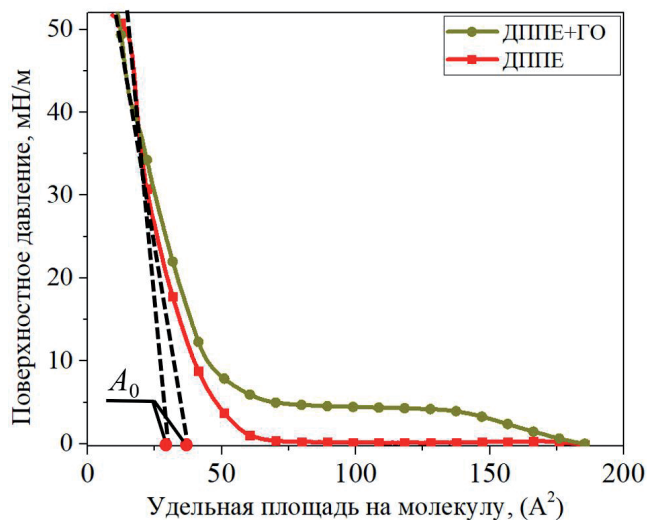


Рис. 1. Изотермы сжатия монослоя DPPE, сформированного на субфазе при наличии и в отсутствии растворенных молекул фермента глюкозооксидазы. Точки A_0 – площади, занимаемые одной молекулой в ненаклонно-конденсированной фазе.

(к). Величина A_0 совпадает с абсциссой точки пересечения касательной, проведенной к конденсированной фазе графика изотермы сжатия монослоя. Для вычисления модуля сжатия использовали формулу [14]:

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

где A_0 – удельная площадь на молекулу в ненаклонно-конденсированной фазе, k – модуль сжатия монослоя, A – площадь, занимаемая монослоем. Величины k , A_0 приведены в **Таблице 1**.

Перенос монослоев на твердые подложки осуществлялся по методу Ленгмюра-Блоджетт при равновесном значении поверхностного давления (π_e). В качестве подложек был использован атомарно-гладкий высокоориентированный пирографит.

Таблица 1

Модуль сжатия (k) и площадь, занимаемая одной молекулой в ненаклонно-конденсированной фазе монослоя DPPE (A_0), сформированного при наличии (DPPE+ГО) и в отсутствии (DPPE) растворенных в субфазе молекул фермента, π_e – равновесное давление

Параметр монослоя	DPPE	DPPE+ГО
k	133	87
A_0	32.5	49
π_e	37.5	42

2.2 ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ ПОВЕРХНОСТИ ПЛЕНОК

Изучение морфологии поверхности проводилось с помощью метода атомно-силовой микроскопии на установке NT-MDT Ntegra в гибридной моде со скоростью сканирования одной строки 0.79 Гц. Был использован кантилевер NT-MDT серии NSG10 с радиусом закругления зонда, не превышающим 10 нм. Обработка изображения и вычисление величины средней шероховатости и толщины пленки выполнялось в открытом программном обеспечении Gwyddion 2.63.

2.3. ИЗУЧЕНИЕ СЕНСОРНЫХ СВОЙСТВ ПЛЕНОК ЛЕНГМЮРА-БЛОДЖЕТТ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ ФЕРМЕНТОМ ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Для измерения электрофизических параметров созданных пленок использовался потенциостат Р-45Х. Изучение сенсорных свойств сформированных покрытий происходило по следующей методике. Сформированные ленгмюровские монослои с иммобилизованным ферментом ГО сжимались до давления π_e . Далее монослои методом Ленгмюра-Блоджетт переносились на графитовые электроды диаметром 2 мм со скоростью проноса электродов через поверхность воды 1 мм/мин. Таким образом были сформированы сенсорные покрытия, состоящие из 2 ленгмюровских монослоев с иммобилизованным ферментом глюкозооксидазы. Электроды помещались на расстоянии 5 мм друг от друга в резервуар с 2 мл раствора глюкозы различной концентрации. Для исключения влияния электромагнитных наводок измерительная ячейка помещалась в стальной бокс с металлической крышкой. Вольтамперограммы измеряемых растворов снимались в диапазоне изменения потенциала от -1 В до $+1$ В со скоростью развертки напряжения 0.2 мВ/с. Измерение полного импеданса проводилось в диапазоне частот от 50 КГц до 4 КГц с напряжением смещения 0.8 В.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА АДСОРБЦИИ МОЛЕКУЛ ГЛЮКОЗООКСИДАЗЫ

Из анализа изотерм сжатия, представленных на Рис. 1, видно, что адсорбция молекул фермента приводит к изменению вида изотермы сжатия.

Момент фазового перехода между жидкой фазой и наклонной-конденсированной фазой растягивается. Участок изотермы сжатия II-III появляется в случаях увеличения вклада в рост поверхностного давления от взаимодействия головных групп молекул ПАВ. Адсорбция молекул ГО привела к уменьшению модуля сжатия монослоя k со 133 мН/м до 87 мН/м и увеличению A_0 с 32.5 \AA^2 до 49 \AA^2 . Таким образом, можно сделать вывод, что адсорбция молекул ГО монослоем DPPE оказывает расширяющее воздействие на монослой [15]. Стоит отметить, что после достижения давления коллапса на изотерме сжатия наблюдался излом, после которого величина поверхностного давления оставалась постоянной. Наличие подобного участка объясняется началом формирования мультислойной мембраноподобной структуры [16].

Изучение процесса адсорбции молекул ГО пленкой DPPE происходило в два этапа. На первом этапе устанавливалась величина равновесного давления, при котором впоследствии происходил перенос монослоя на твердые подложки – π_c . Для этого монослой сжимался до величины поверхностного давления, соответствующего середине ненаклонно-конденсированной фазы, после чего процесс сжатия прекращался. Дальнейшее изменение величины поверхностного давления связано с протеканием релаксационных процессов в монослое. Для их анализа в автоматическом режиме происходила запись изменения величины поверхностного давления (π) от времени (t). График зависимости $\pi(t)$ приведен на Рис. 2. Координата точки пересечения проекции

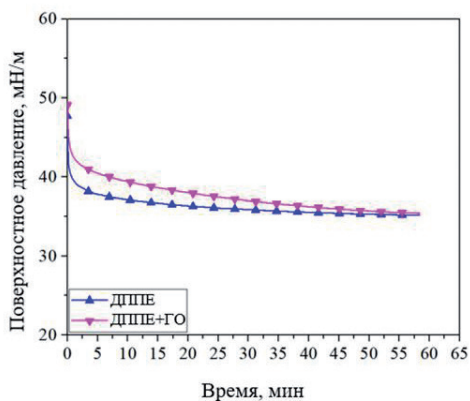


Рис. 2. Графики убыли поверхностного давления монослоев DPPE, полученные на субфазе в присутствии и отсутствии растворенных молекул фермента, при постоянной площади монослоя.

линейной части графика $\pi(t)$ и оси ординат (π) соответствует величине равновесного давления π_c , при котором выравниваются скорости адсорбции и десорбции вещества монослоя в субфазу [17]. Значение тангенса угла наклона линейной части графика $\pi(t)$ соответствует скорости убыли поверхностного давления (k_d) вследствие структурной реорганизации молекул в монослое, а также в связи с возможным уходом части вещества монослоя под воду [18,19]. Из Рис. 2 видно, что адсорбция молекул ГО приводила к увеличению k_d и π_c с $0.5 \cdot 10^{-3}$ и 37.5 мН/м до $1.2 \cdot 10^{-3}$ и 42 мН/м, соответственно.

Для определения механизма убыли вещества монослоя в субфазу был использован метод, основанный на анализе кривых десорбции в координатах относительной убыли площади от времени. Для этого были записаны кривые убыли площади монослоя при постоянном поверхностном давлении вблизи точки фазового перехода монослоя двумерная жидкость – конденсированная пленка. На Рис. 3 приведены графики изменения относительной площади монослоя от времени для монослоев DPPE, сформированных на субфазе при наличии и в отсутствии растворенных молекул ГО. На представленных кривых десорбции можно выделить два участка, аппроксимирующихся линейной зависимостью. Это связано с наличием нескольких механизмов десорбции вещества монослоя в приповерхностный слой.

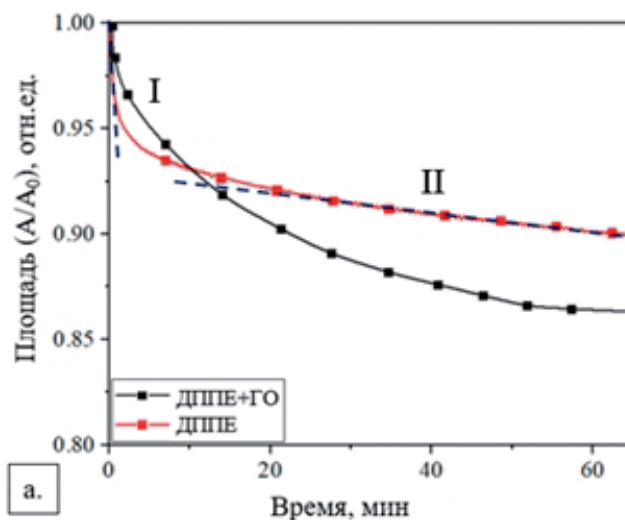


Рис. 3. Графики убыли площади монослоев DPPE, полученные на субфазе в присутствии и отсутствии растворенных молекул фермента, при постоянной площади монослоя.

В литературе выделяют два типа десорбции. Первый это десорбция, контролируемая уходом вещества монослоя в приповерхностный слой конечной толщины. И второй – это диффузионный переход молекул монослоя из статичного приповерхностного слоя вглубь субфазы. На графике десорбции, представленном на Рис. 3, участки с первым и вторым механизмом десорбции отмечены цифрами (I) и (II), соответственно. Для описания процессов десорбции (I) и (II) были использованы выражения (1) и (2) [20,21]:

$$\ln \frac{A}{A_0} = -k_s t, \quad (2)$$

$$\ln \frac{A}{A_0} = -k_v t, \quad (3)$$

где A/A_0 – относительное изменение площади монослоя за время t , k_v и k_s коэффициенты десорбции и диффузии, соответственно.

Численные значения коэффициентов k_s и k_v соответствуют углу наклона линейных участков кривых убыли площади, представленных на Рис. 4. Величины k_s и k_v приведены в Таблице 2.

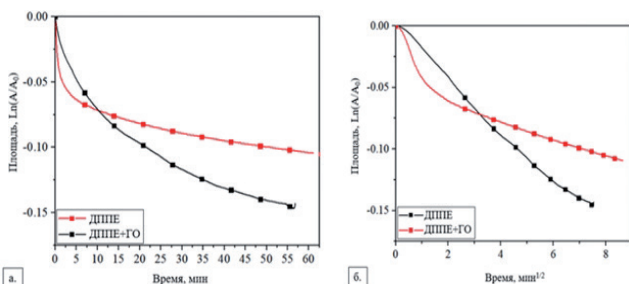


Рис. 4. Кривые убыли площади монослоев DPPE (а,б), сформированных при наличии и в отсутствии растворенных в субфазе молекул фермента.

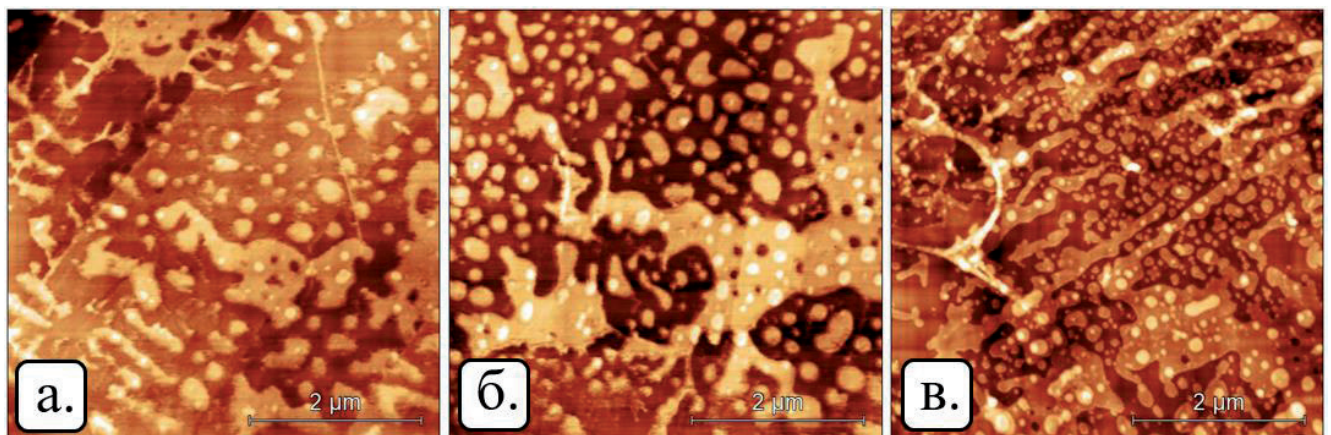


Рис. 5. Изображения морфологии поверхности монослойных пленок DPPE, сформированных на субфазе, содержащей ГО, при временах адсорбции ГО 5 минут (а), 30 минут (б) и 60 минут (в).

Таблица 2

Коэффициенты десорбции монослоев DPPE, сформированных на субфазе при наличии и в отсутствии растворенных молекул ГО

	DPPE	DPPE+ГО
T, мин	3	12
k_s	$5 \cdot 10^{-4}$	$6 \cdot 10^{-4}$
k_v	$3.3 \cdot 10^{-2}$	$1.1 \cdot 10^{-2}$
k_d	$0.5 \cdot 10^{-3}$	$1.2 \cdot 10^{-3}$

Из Таблицы 2 видно, что адсорбция молекул ГО монослоем DPPE приводит к изменению коэффициентов десорбции, контролируемой переходом вещества монослоя в приповерхностный слой и переходом вещества из приповерхностного слоя вглубь субфазы. Коэффициент k_s увеличивается с $5 \cdot 10^{-4}$ до $6 \cdot 10^{-4}$, а k_v уменьшается с $3.3 \cdot 10^{-2}$ до $1.1 \cdot 10^{-2}$ при наличии в субфазе молекул фермента. Наличие молекул ГО в субфазе приводит к уменьшению скорости десорбции, контролируемой переходом вещества монослоя в приповерхностный слой и увеличению скорости перехода молекул вещества из приповерхностного слоя вглубь субфазы.

3.2 ВЛИЯНИЕ ВРЕМЕНИ АДСОРБЦИИ ФЕРМЕНТА НА МОРФОЛОГИЮ ПОВЕРХНОСТИ СФОРМИРОВАННЫХ ПЛЕНОК

На Рис. 5 представлены изображения морфологии поверхности монослойных пленок DPPE с адсорбированными агрегатами молекул ГО, перенесенных при различных временах адсорбции. В Таблице 3 приведены значения величин шероховатости сформированных пленок, средней толщины и средней площади поверхности пленок.

Таблица 3

Средняя шероховатость (R_a), толщина (L) и площадь поверхности (S_q) монослойных пленок DPPE, перенесенных при различных временах адсорбции фермента

Время адсорбции	5	30	60
R_a , нм	3.6	3.3	2.4
S_q , мкм ²	0.3	0.3	0.3
L , нм	10.7	10.4	8.7

Адсорбция ГО монослоями приводит к изменению морфологии пленок, полученных на их основе. При адсорбции ГО монослоем DPPE в течении 5 минут на поверхности пленки образуются области с высотой от 12 до 24 нм. Молекула ГО имеет размеры $6 \times 5.2 \times 7$ нм [22], в то время как монослой DPPE имеет толщину порядка 3 нм. Таким образом, можно сделать вывод, что данные области представляют собой агрегаты молекул ГО, адсорбированные монослоем молекул DPPE. При увеличении времени адсорбции до 30 минут происходит увеличение площади, занимаемой островками ГО. При этом толщина отдельных участков увеличивается до 25-30 нм. Средняя шероховатость пленки уменьшается с 3.6 нм до 3.3 нм, что можно объяснить увеличением площади, занимаемой агрегатами ГО. Дальнейшее увеличение времени адсорбции до 60 минут приводит к уменьшению шероховатости поверхности и средней толщины пленки. Указанное поведение можно связать с уменьшением скорости перехода вещества монослоя в диффузионный слой. В следствии чего площадь, покрываемая агрегатами молекул ГО, увеличивается. Вместе с этим уменьшается высота отдельных агрегатов до 22-25 нм.

Увеличение времени адсорбции фермента ГО пленкой приводит к изменению ее морфологии. Наиболее развитой морфологией обладает пленка, перенесенная через 5 минут после выдержки монослоя при постоянном давлении (общее время адсорбции, включая время сжатия монослоя подвижными барьерами – 125 минут). Дальнейшая адсорбция приводит к уменьшению средней шероховатости поверхности и средней толщины пленки. Поэтому для формирования сенсорного покрытия был использован монослой, со временем адсорбции 30 минут.

3.3. ИЗУЧЕНИЕ СЕНСОРНЫХ СВОЙСТВ СФОРМИРОВАННЫХ ПОКРЫТИЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМИ, ИМПЕДАНСОМЕТРИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Сформированные сенсорные покрытия были исследованы методом циклической вольтамперометрии. Циклические вольтамперограммы и графики изменения максимальных токов между электродами при различной концентрации глюкозы в растворе приведены на Рис. 6. Для биопленки с иммобилизованным ферментом ГО наблюдается линейная зависимость тока от концентрации глюкозы в растворе. Увеличение тока при увеличении концентрации до 0.9 мг/мл составляет 0.25 мкА для прямого смещения и 0.35 мкА для обратного. В отсутствие биопленки на электродах концентрационные изменения тока носят случайный характер. Большие значения рабочих токов объясняются отсутствием на электродах пленки из липидных молекул, представляющей из себя диэлектрик.

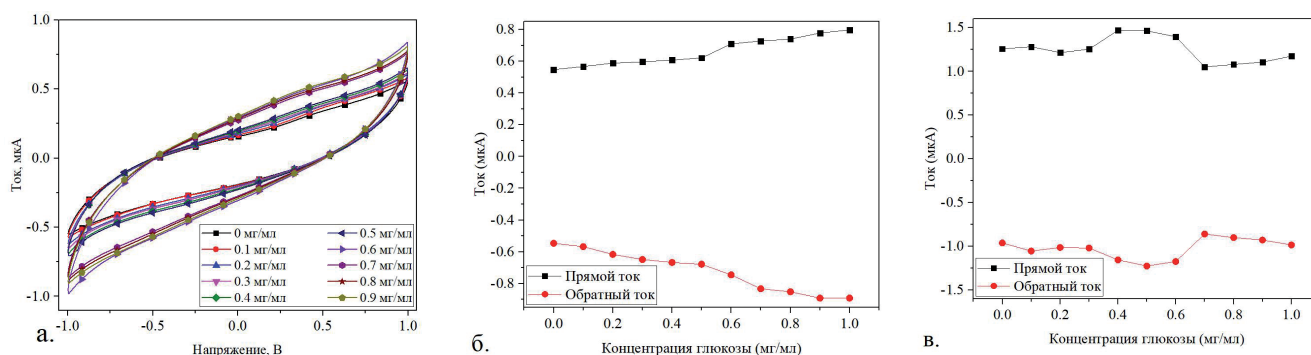
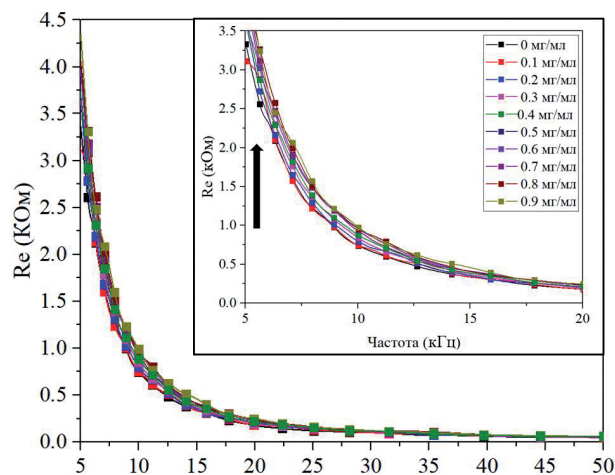
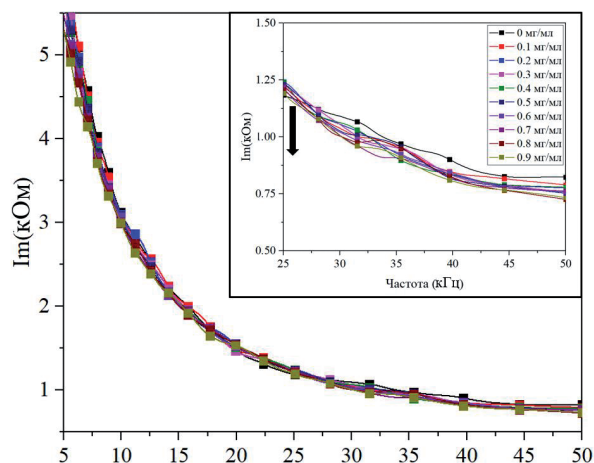


Рис. 6. Циклические вольтамперограммы (а) и изменение максимальных величин прямого и обратного токов при наличии (б) и в отсутствие сенсорной пленки (в) при различной концентрации глюкозы в растворе.



а. Частота (кГц)

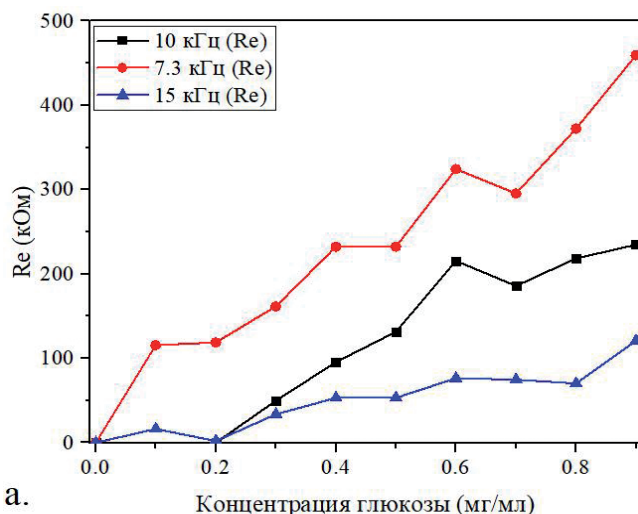


б. Частота (кГц)

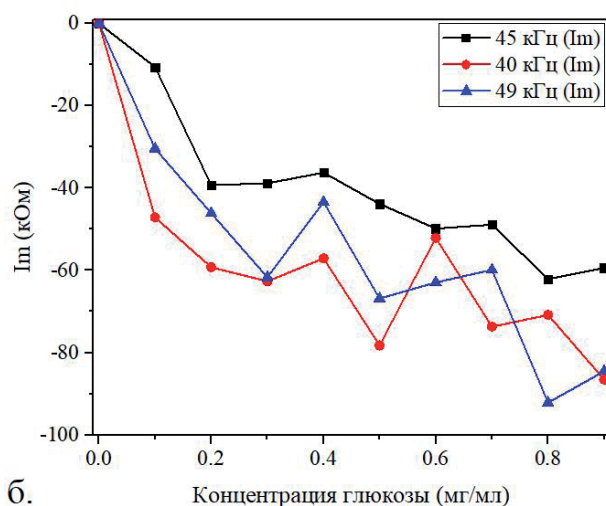
Рис. 7. Частотные зависимости действительной (а) и мнимой (б) частей полного импеданса системы при различных концентрациях молекул глюкозы в растворе.

На Рис. 7 представлены частотные зависимости действительной (а) и мнимой (б) частей полного импеданса измеряемой ячейки при различных концентрациях молекул глюкозы в растворе. В частотном диапазоне от 5 до 20 кГц и от 30 до 50 кГц можно выделить частоты, для которых концентрационная зависимость действительной и мнимой частей импеданса монотонна.

Так, концентрационная зависимость действительной части импеданса на частотах 7.3 кГц, 10 кГц и 15 кГц имеет сублинейный вид. Концентрационная зависимость мнимой части импеданса на частотах 40 кГц, 45 кГц и 49 кГц может быть аппроксимирована экспоненциальной функцией. Соответствующие концентрационные зависимости приведены на Рис. 8.



а. Концентрация глюкозы (мг/мл)



б. Концентрация глюкозы (мг/мл)

Рис. 8. Концентрационные зависимости действительной (а) и мнимой (б) частей полного импеданса системы для соответствующих частот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе изучено влияние времени адсорбции молекул глюкозооксидазы на поверхностные свойства лентмюровских монослоев DPPE и их морфологию. На основе сформированных монослоев были созданы сенсорные бислоиные покрытия. Отличия во времени адсорбции фермента приводит к возникновению отличий в морфологии пленок. Был исследован процесс встраивания молекул фермента глюкозооксидазы в лентмюровский монослой липидных молекул DPPE. Адсорбция молекул GO_x оказывает расширяющее действие на лентмюровский монослой DPPE. Адсорбция молекул GO_x приводит к структурной перестройке монослоя, сопровождающейся увеличением удельной площади монослоя, уменьшением скорости

убыли поверхностного давления и увеличения давления π_c . При адсорбции ГО монослоем DPPE уменьшается скорость заполнения приповерхностного диффузионного слоя, но при этом увеличивается скорость перехода молекул из диффузионного слоя в объем субфазы. Увеличение удельной площади на одну молекулу при адсорбции фермента монослоем связано с всплыванием фермента и образованием на границе раздела вода-воздух адсорбционного монослоя Гиббса, который в последствии сжимается формирующимся монослоем липидных молекул. В результате при сжатии монослоя происходит смещение положения всех формируемых фаз в область больших площадей. Увеличение времени адсорбции молекул ГО_x приводит к уменьшению средней шероховатости пленки и ее толщины.

Вольтамперометрия и импедансометрия пленок показала наличие чувствительности сенсорного покрытия к молекулам глюкозы в водных растворах. Наличие линейной концентрационной зависимости максимальных и минимальных токов и сопротивлений в диапазоне концентраций глюкозы от 0 до 1 мг/мл делает подобные сенсорные покрытия перспективными для использования в качестве сенсорных покрытий.

Таким образом, продемонстрирована возможность создания ферментативного биосенсора глюкозы на основе ЛБ-пленки из молекул фосфолипида DPPE с иммобилизованными молекулами фермента глюкозооксидазы. Главным достоинством подобных биосенсоров являются высокие показатели селективности и чувствительности по отношению к детектируемым молекулам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ariga K, Nakanishi T, Michinobu T. Immobilization of Biomaterials to Nano-Assembled Films (Self-Assembled Monolayers, Langmuir-Blodgett Films and Layer-by-Layer Assemblies) and Their Related Functions. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2006, 6:2278-2301.
2. Caseli L. Enzymes immobilized in Langmuir-Blodgett films: Why determining the surface properties in Langmuir monolayer is important?. *An Acad Bras Cienc*, 2018, 90:631-644.
3. Rodrigues RT, Nordi CFS, Siqueira Junior JS, Caseli L. Effect of interfering agents for urease immobilized in Langmuir-Blodgett films of controlled molecular architecture. *Thin Solid Films*, 2020, 704:138043.
4. Gorbachev IA, Smirnov AV. Biosensor based on Langmuir-Blodgett film with alcohol oxidase enzyme. *RENSIT: Radioelectronics. Nanosystems. Information Technologies*, 2023, 15(3):307-316. DOI: 10.17725/rensit.2023.15.307.
5. Zaitsev SY. Functional Langmuir films with glucose oxidase. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 1993, 75:211-216.
6. Wang K-H, Syu M-J, Chang C-H, Lee Y-L. Immobilization of glucose oxidase by Langmuir-Blodgett technique for fabrication of glucose biosensors: Headgroup effects of template monolayers. *Sensors and Actuators B*, 164:29-36.
7. Furtado FAS, Caseli L. Enzyme activity preservation for galactose oxidase immobilized in stearic acid Langmuir-Blodgett films. *Thin Solid Films*, 2020, 709:138253.
8. Saha S, Chowdhury J. Sustained and improved enzymatic activity of trypsin immobilized in the Langmuir Blodgett film of DPPC: A rapid enzyme sensor for the detection of Azocasein. *Materials Chemistry and Physics*, 2020, 243:122647.
9. Gorbachev IA, Smirnov AV, Kuznetsova IE, Kolesov VV. Temperature influence on the formation of Langmuir monolayers with Ni arachidic acid and Ni arachidate clusters. *RENSIT: Radioelectronics. Nanosystems. Information Technologies*, 2023, 15(3):295-306. DOI: 10.17725/rensit.2023.15.295.
10. 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.
11. Zhang J, Rosilio V, Goldmann M, Boissonnade M-M, Baszkin A. Adsorption of Glucose Oxidase into Lipid Monolayers. Effect of Lipid Chain Lengths on the Stability and Structure of Mixed Enzyme/Phospholipid Films. *Langmuir*, 2000, 16:1226-1232.
12. Lee Y-L, Lin J-Y, Lee S. Adsorption Behavior of Glucose Oxidase on a Dipalmitoylphosphatic

- Acid Monolayer and the Characteristics of the Mixed Monolayer at Air/Liquid Interfaces. *Langmuir*, 2007, 23:2042-2051.
13. Ohnuki H, Saiki T, Kusakari A, Endo H, Ichihara M, Izumi M. Incorporation of Glucose Oxidase into Langmuir-Blodgett Films Based on Prussian Blue Applied to Amperometric Glucose Biosensor. *Langmuir*, 2007, 23:4675-4681.
 14. Vu TT, Kharitonova NV, Maiorova LA, Gromova OA, Torshin IY, Koifman OI, Compression Speed as a Parameter Changing the Dimensionality of Corrole Nanostructures in Layers at the Air-Water Interface. *Macrobicycles*, 2018, 11(3):286-292.
 15. Янклович АИ, Регулярные мультимолекулярные структуры ПАВ – пленки Лэнгмюра-Блоджетт. *Успехи коллоидной химии*. Ленинград, Химия, 1991, 262- 291.
 16. Gopal A, Lee KYC. Headgroup Percolation and Collapse of Condensed Langmuir Monolayers. *J. Phys. Chem. B*, 2006, 110:22079-22087.
 17. Sanchez CC, Nino MRR, Patino JMR. Relaxation phenomena in monoglyceride films at the air-water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 1999, 12:175-192.
 18. Rabinovitch W, Robertson RF, Mason AG. Relaxation of surface pressure and collapse of unimolecular films of stearic acid. *Can. J. Chem.*, 1960, 38:1881-1890.
 19. Нас-Вydro K, Wydro P, Dynarowicz-Latka P. Metal ions binding to tri-n-octylphosphine oxide (TOPO) monolayer spread at the air/water interface. *Thin Solid Films*, 2008, 516:8839-8843.
 20. Gorbachev IA, Shtykov SN, Brezesinski G, Glukhovskoy EG. Studying of Quantum Dots Langmuir Monolayers Stability at the Different Subphase Temperature. *BioNanoSci.*, 2017, 7:686-691.
 21. Ter-Minassian-Saraga L. Recent work on spread monolayers, adsorption and desorption. *Journal of Colloid Science*, 1956, 11:398-418.
 22. Hecht HJ, Kalisz HM, Hendle J, Schmid RD, Schomburg D. Crystal Structure of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* Refined at 2.3 Å Reslution. *Journal of molecular biology*, 1993, 229(1):153-172.
- Горбачев Илья Алексеевич**
к.х.н., с.н.с.
ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН
Москва 125009, Россия
E-mail: iliyagor36@gmail.com
- Колесов Владимир Владимирович**
к.ф.-м.н., с.н.с.
ИРЭ им. В.А. Котельникова РАН
Москва 125009, Россия
E-mail: kvv@cplire.ru