



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО

КАТЕДРА „Биотехнология“

Ахмед Хассан Анвар Хассаан

ТЕМА

**" Дизайн на оптичен биосензор за откриване
натоксични съединения и фармацевтични продукти"**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ по
научна специалност 4.2. Химически науки

(Биоорганична химия, химия на природните и физиологично активните
вещества)

Научен ръководител: Проф. д-р. инж. Любов Йотова

Научно жури: 1. Доц.д-р. инж.Данчо Даналев- председател, рецензент

2. Проф. д-р. инж.Любов Йотова

3. Доц.дхн. Иванка Стойнева- рецензент

4. Доц.д-р. инж.Иван Иванов

5. Проф.дбн. Яна Топалова

София, 2015

Дисертационният труд е написан на 126 страници, съдържа 57 фигури и 22 таблици. Цитирани са 189 източника.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет за защита на заседание на катедра “Биотехнология” на 15.12.2015.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 28.03.2016 г. от 14:00 часа в зала 424, сграда „А” на ХТМУ.

Материалите са на разположение на интересуващите се на интернет страницата на ХТМУ и в отдел „Научни дейности”, стая 406, етаж 4, сграда „А” на ХТМУ.

Използвани съкращения

CAB	Целулозен ацетат бутират
CAP	Целулозен ацетат пропионат
FTIR	Фурие- трансмисионна инфрачервена спектроскопия
H ₂ O ₂	водороден пероксид
HRP	пероксидаза от хрян
MTES	Метилтриетоксисилан
PAMAM	Поли (амидоамин) дендримери
SiO ₂	силикат
TMOS	тетраметоксисилан

Въведение

Биосензорите са малки аналитични устройства, които използват биологични реакции за откриване на наличие на целеви Вещества. Оптичните биосензори се основават главно на промените в абсорбцията или флуоресценцията за определяне наличието на целевите аналити.

Разработването на биосензори като алтернативен метод за бързо откриване на различни токсични съединения и следи от лекарства, които могат да причинят сериозни здравословни проблеми, са били област на активни изследвания през последното десетилетие. Биосензорите са успешен инструмент в сравнение със съществуващите традиционни скъпи и сложни техники за откриване, като се отличават и с висока специфичност, ефективност, директна употреба, надеждност и ефективност на разходите.

Ензимите са най-подходящите молекули за биологично разпознаване за употреба в биосензори заради тяхната отлична селективност, заради тяхното целенасочено субстратно действие и висока каталитична активност. Но ензимите са скъпи, ограничени като количество и бързо губят активност. Биосензорите, базирани на ензимна имобилизация, могат ефективно да използват ензими, като се избягват недостатъците и така представляват прости и евтини инструменти за бързо откриване на различни съединения от храни, фармацевтични и екологични дейности и отрасли.

Предишни изследвания докладват употребата на пероксидази за катализиране на окислението на различни субстрати в присъствието на H_2O_2 . HRP се използва в конюгати за откриване на наличието на целеви съединения и дава характерна реакция, която се открива чрез спектрофотометрични методи. Сигналите, получени с помощта на пероксидази може да се основават на колориметрия, хемилуминесценция, флуоресценция или амперометрични измервания.

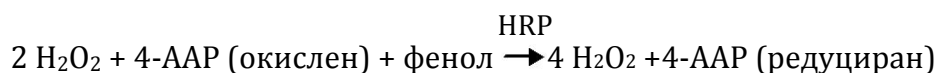


Схема 1.1. Ензимно окисление с HRP (EC 1.11.1.10).

Имобилизацията на ензими трябва да се осъществи чрез адсорбция, ковалентно свързване, или Включване в полимерни структури.

Ролята на силикатите

Силициевият диоксид (силициев двуокис/ SiO_2) се намира в природата под различни форми на силициев диоксид или силикати, които са вторият най-разпространен елемент след кислорода (27.7% от земната кора по маса).

Силициевият диоксид се използва за напреднало приложение при биосензорите, покрития, за орално доставяне на лекарства и др. Силициевият диоксид има много

добри качества като: (I) наличие в много форми; (II) ниска топлопроводимост; (III) нисък коефициент на термично разширение и висока устойчивост на термичен шок; (IV) регулируеми оптични свойства (от прозрачни до непрозрачни); (V) електрическо съпротивление; (VI) химична стабилност в разтвор в относително голям диапазон на pH; (VII) химическа функционалност, подлежаща на моделиране; и (VIII) високи модул на еластичност и устойчивост на износване, всеки от които може да бъде настроен в зависимост от обработката и така да бъде изключително полезен в оптични, биологични и каталитични приложения.

Процес на зол-гел

Процесът Sol-gel се дефинира като метод за Получаванена твърди материали чрез малки молекули, използвайки редица процеси, чрез които разтворът (зол) се превръща в твърда маса без течност подобна на гел. Хидролизата и кондензацията са двете основни стъпки, включени в процеса зол- гел.

Ползването на този метод показва предимства като гъвкавост и лесна за възпроизвеждане техника за производство на материали с подобрени свойства на повърхността, порьозност и прозрачност.

Дендримерите

Дендримерите са силно разклонени молекули симетрично, разположени около ядрото си, като сферична три-триизмерна структура. Дендримерите произхождат от гръцката дума "Dendron", която означава "дърво". Дендримерите биха могли да се използват за много приложения като биосензори, като носители за Имобиализиране на малки молекули, лекарства или дори наночастици в рамките на тяхната вътрешност чрез електростатични или хидрофобни взаимодействия или чрез свързване на тези молекули до функционални групи, съществуващи на повърхността; като amino- и карбоксилна- групи. Поради високото съотношение повърхност - обем, те подобряват ефективността и чувствителността на биосензорите.

В рамките на работата ни е разработен оптичен биосензор за детекция и следене на вещества и лекарства, притежаващи окисляеми групи. Разработката е базирана на ковалентно имобиализиране на ензим до хибридни мембрани.

ИЗВОДИ ОТ ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР

Въз основа на направената литературна справка са направени следните изводи:

- Зол-гелната техника е една от най-подходящите за синтез на хибридни материали, тъй като реакционните температури са близки до стайната, в резултат на което органичните единици се запазват след синтеза. Този метод може да предложи многофункционалност, както и позволява контрол на свойствата от атомно до мезо ниво, много висока степен на чистота и получаването на изключително хомогенни материали.
- Досегашните изследвания и доклади са посветени на създаването на ефективен протокол, както за получаването на компонентите на биосензорите, като мембрани например, така и на методите за имобилизиране, за да се достигнат повишени нива на чувствителност, в сравнение със съществуващите конвенционални техники.
 - Голямо внимание е обърнато на откриването на токсични те компоненти, при използването на електрохимични и оптични биосензори.
 - SiO₂ Е ценен и икономически значим компонент, който е приложим с редица ефекти към биосензорите с подобрени свйства и ефикасност.
 - HRP може да се използва за получаване на по-добре уловим сигнал и ефективен процес на разпознаване.

При повечето предишни изследвания, конструкцията на биосензорите включва сложна процедура и постановка, така че все по-необходима става простата и ефективна платформа, за разпознаване на тези компоненти.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящия дисертационен труд е: „ да се създадат ефективни оптични биосензори, основани на едновременната ковалентна имобилизация на ензими в нова хибридна мембрана, която да предостави ефективно поле за разпознаване на податливите на окисление токсични компоненти и фармацевтични продукти".

За постигане на поставената цел пред нас стояха следните задачи:

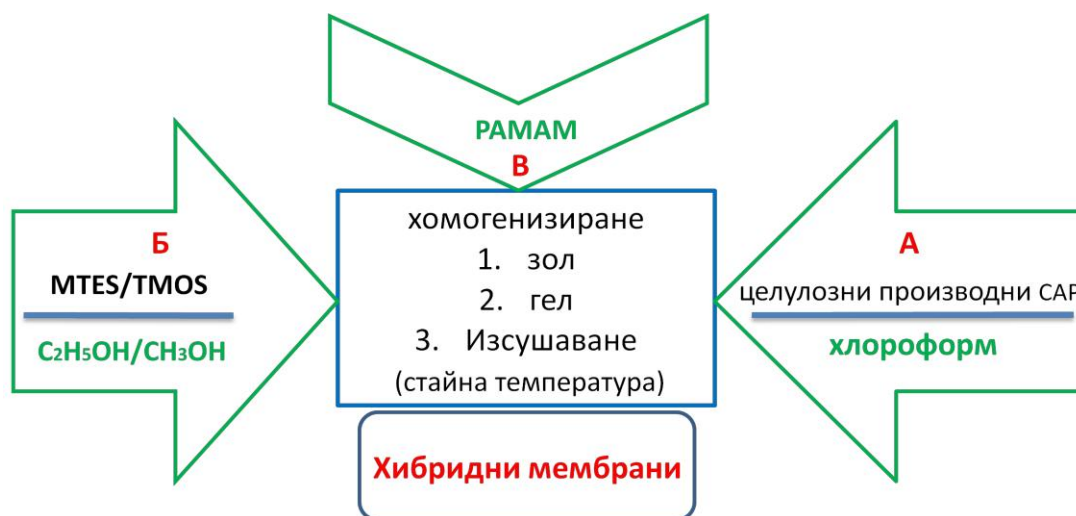
- Създаване на нови хибридни мембрани, подходящи за получаването на оптични биосензори с техника зол-гел.
- Изучаване и оптимизиране на HRP, имобилизирана върху различни мембрани, за постигане на по-голямо количество имобилизирана и активна HRP
- Изучаване на каталитичните свойства на HRP, която се използва за моделен ензим за подбор на по-подходящи мембрани за приложение при последващо разпознаване.
- Оптимизиране на процедурните условия при имобилизирането на HRP за получаването на най-добрите условия на чувствителност.
- Синтез на силициеви частици с еднороден размер и точно съотношение на добавяне на останалите компоненти за производството на мембраните с оглед подобряването на каталитичните свойства на имобилизирания ензим и тези на произведените мембрани.
- Проверка на системата с разпознаване на различни вещества.
- Изучаване на диапазона на разпознаване, възможността за възпроизвеждане, стабилността и свойствата на системата.
- Характеризиране на етапите в производството на мембраните, синтезираните силициеви наночастици и доказване на ковалентното свързване на ензима върху мембраните.

Материали и методи

Синтез на хибридните мембрана със Зол-гел метод:

Той е направен чрез неорганичен Зол - гел процес с участието на органични съставки като полимерни материали, които могат да взаимодействат и да се свързват химически с неорганичните метални алкоксиди.

Три групи от новите хибриди мембрани са приготвени чрез Зол-гел метод с участието на различни силикатни прекурсори като неорганична част като метилтриетоксисилан (MTES) и триметоксисилан (TMOS), както е показано на фигура 1.2.



Фигура 1.2 Илюстрация на Зол-гел синтез на хибридни мембрани

Приготвят се два разтвора, разтвор А се приготвя с добавянето на 1мл TMOS към 6мл CH_3OH или 1мл MTES към 6 мл $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ и след това се добавя 1 капка HCl , провежда се хидролизна реакция при стайна температура при интензивно разбъркване на 25°C за 2.5 часа за всеки силикатен прекурсор. Разтвор В се приготвя с използването на хлороформ като разтворител за 1.5 г CAP/L или 1.5 г САВ/Н, след като целулозните деривати са добре разтворени с бъркане, 50 μl ПАМAM (2ра генерация), разтворени в 5ml хлороформ се добавят с непрекъснато бъркане и се оставят да се хомогенизират за 3 часа при стайна температура. Разтвор А се добавя към разтвор В и реакционната смес се оставя на стайна температура 25°C при непрекъснато разбъркване за още 2 часа. Реакционната смес е прозрачна и хомогенна по време на целия процес.

За изучаването и оптимизирането на имобилизирането на ензима HRP са създадени хибридни мембрани. Те са разделени в три основни групи, както следва:

Първата група съдържа само CAP/L или CAB/H с PAMAM (Без силикатни прекурсори), втората има TMOS и силикатни прекурсори, а третата има MTES.

Имобилизиране на HRP като моделен ензим

HRP е имобилизирана по метода на Záborský и Ogletree, чрез окисление на въглехидратните й остатъци и ковалентно свързване със съдържащите аминокрупи PAMAM дендримери, в приготвените хибридни мембрани и при меки условия.

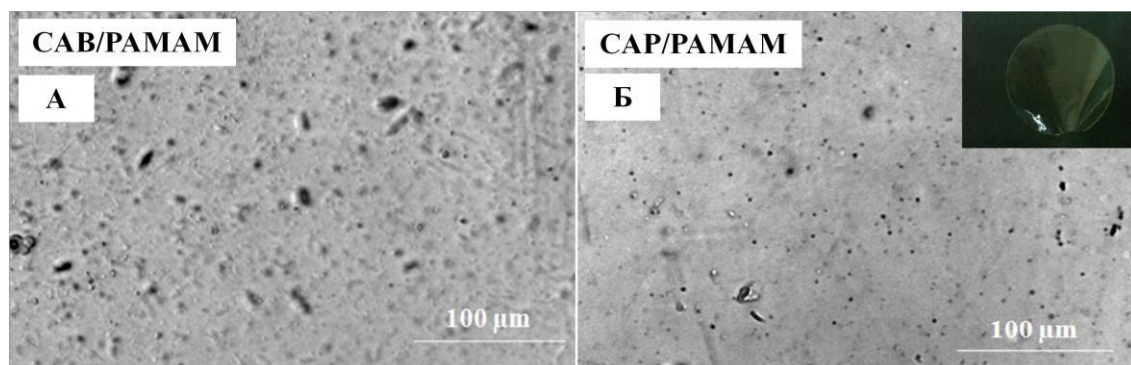
Мембраните са приготвени, чрез използване на желиращ процес, който е оптимизиран, а свойствата на мембраните са подсилени, посредством предварително вграждане на силикатни наночастици. HRP е имобилизиран като моделен ензим, а процесът на имобилизация е оптимизиран. Работните условия на биосензора също са оптимизирани и тествани.

Накрая системата се тества срещу съединения и лекарства като фенол, резорцинол и парацетамол в присъствието на H_2O_2 . Наблюдава се отговорът на биосензора. Другите параметри като рН, температура, възпроизводимост, обхват, откриване и стабилност на системата също са разгледани.

Резултати и дискусия

Изследване и описване на приготвените мембрани

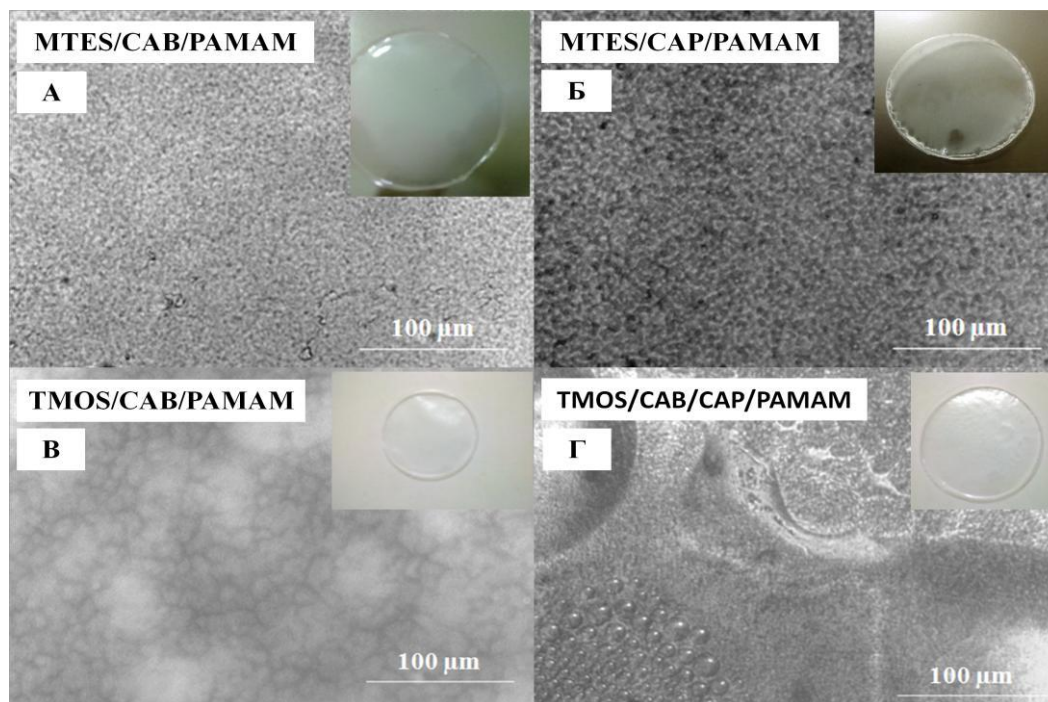
Трите групи хибридни мембрани показват добра еднородност, гъвкавост, равномерно разпределение на силикатните частици, прозрачност и повърхностноактивни свойства.



Фигура 1.3. Оптично-микроскопски изображения на мембранната повърхност.

Фигура 1.3. показва група (1) мембрани, наблюдава се висока и неконтролирана порьозност на мембраните с CAB/H, в сравнение с тези с CAP/L, които показват по-малка и контролирана порьозност с добра прозрачност. Едновременно с това между PAMAM и целулозните деривати не се наблюдава отделяне на фазите. Както е показано на фигура 1.4., мембраната, синтезирана от TMOS/CAB/PAMAM показва равномерно и хомогенно нагъната структура, дължаща се на използваната CAB/H, без да се наблюдават силикатни агрегати, което се изразява

в гладка и прозрачна структура. Едновременно с това MTES/CAB/PAMAM и MTES/CAP/PAMAM са сходни в хомогенността на получената мембранна структура, с добро и равномерно разпределение на SiO₂ частици, водещо до зърнеста структура. От друга страна, хибридните мембрани синтезирани от CAB и CAP в отношение 1:1, заедно с MTES прекурсори, показва фазово разделяне на двата деривата, което води до неравномерна мембранна структура, като CAP е с дребна равномерна, а CAB с едра неконтролирана порьозна структура.



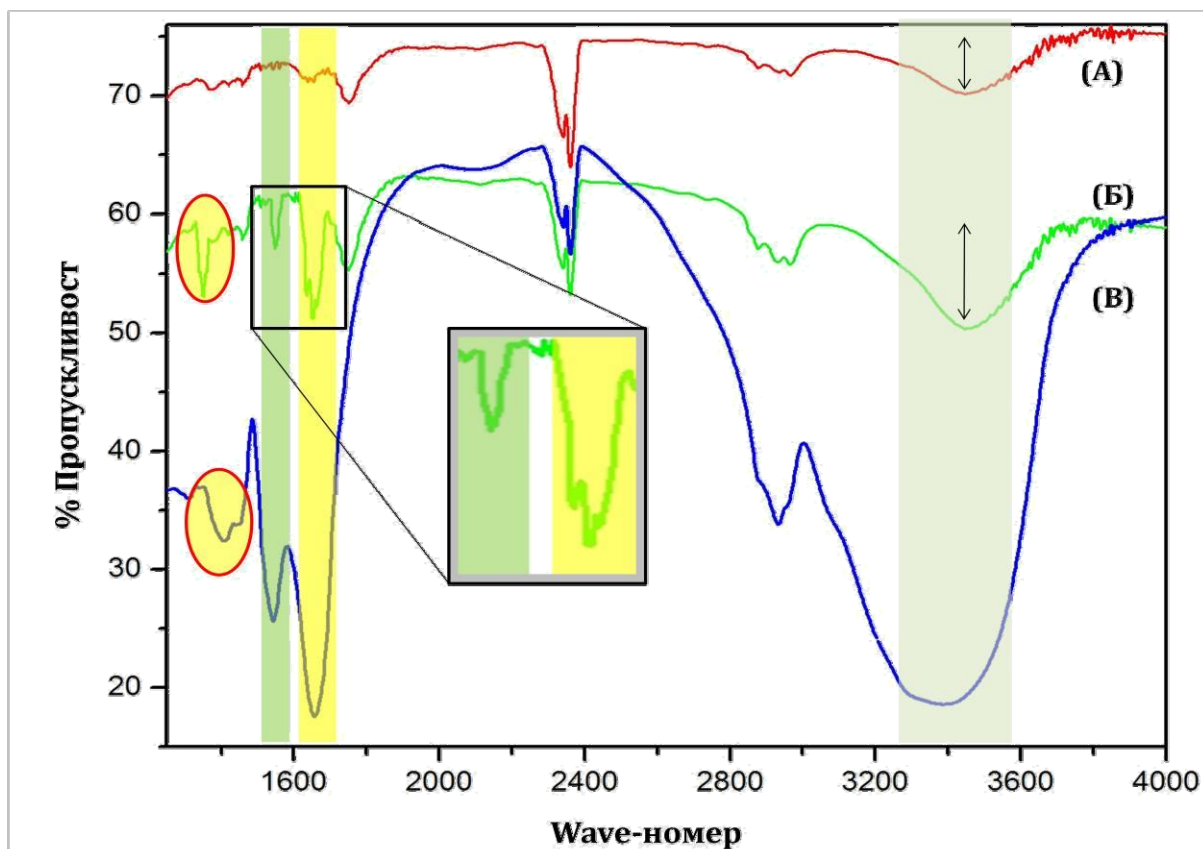
фигура 1.4. Оптично-микроскопски изображения на мембранната повърхност.

Изследване на имобилизацията на HRP

Резултатите показват, че мембраните, съдържащи целулоза ацетат бутирати са по-добри от тези, съдържащи целулоза ацетат пропионати, що се отнася до общото количество имобилизиран ензим, активността и мембранните свойства.

Проучвания на Фурие - трансмисионна инфрачервена спектроскопия

Появата на широк пик в границите от 3100-3550 cm⁻¹ може да бъде съответстващо на -NH- на HRP протеина, увеличението на интензитета на острите върхове при ~ 1650 cm⁻¹, ~1550 cm⁻¹ и (1400-1200 cm⁻¹) се дължи съответно на амид I (-CONH-), амид II и III амид. Изгледът и подобренията на тези пикове показват успешното HRP имобилизиране. Спектърът на амид I и амид II ленти от HRP / матрица са почти същите като тази на HRP, което предполага, че HRP запазва своята основна функция и матричната система осигурява биосъвместим среда за HRP (Фигура 1.5 A, Б и В).



фигура 1.5. ИЧ спектри (а) Матрици (преди имобилизация),
(б) Матрици (след имобилизация), (в) Свободна HRP.

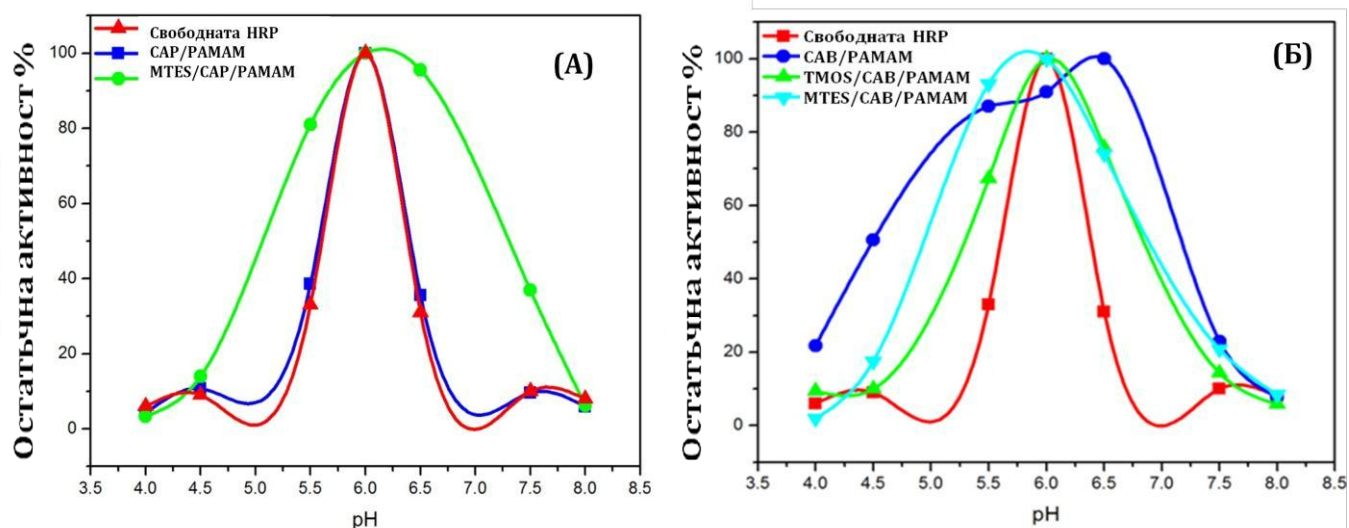
Имобилизиране на HRP върху приготвените мембрани

При сравнение, мембраните с TMOS/CAB показват по-добри резултати където най-високата относителна активност е 58% и 62% съответно за TMOS/CAB и CAB, следвани от CAP и MTES/CAB, които са отчетени съответно с 54% и 53%.

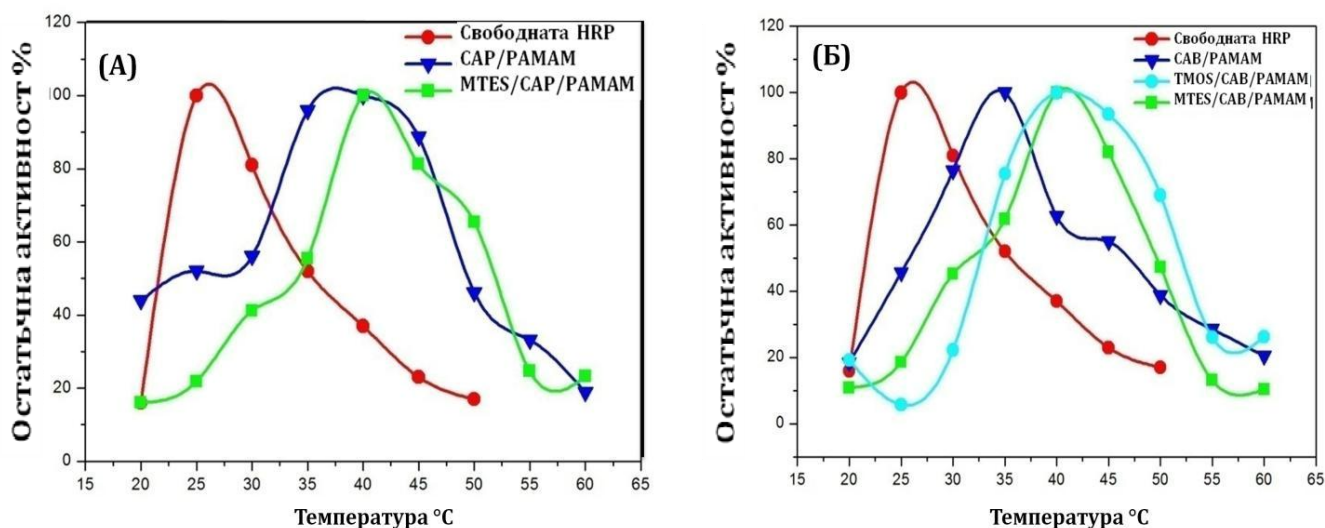
Таблица 1.1. Каталитични свойства на свободната и имобилизирана пероксидаза върху различни мембрани

Но.	композиция	Имобилизиран Протеин/ Абсолютно сухо тегло (мг/г)	Специфич на активност (U/мг)	Относител на активност (%)	Опт.рН	Опт. температура (°C)
1	Свободна HRP	-	67	-	6,0	25
2	CAP/PAMAM	1,4	3,9	54	6,0	40
3	MTES/CAP/PAMAM	1,3	19,2	28	6,0	40
4	CAB/PAMAM	2,6	41,9	62	6,5	35
5	MTES/CAB/PAMAM	1,9	35,7	53	6,0	40
6	TMOS/CAB/PAMAM	2,7	39,2	58	6,0	40

При всички проби е запазена 100% остатъчна активност при оптимално рН 6,0, с изключение на САВ/ПАМАМ, за което е отчетена промяна на рН оптимума на 6,5. Активността намалява, когато рН е твърде кисело или алкално, като гореизложените резултати показват, че имобилизираният ензим е по-устойчив на киселинни и алкални условия, отколкото свободната HRP (фигура 1.6).



фигура 1.6. Ефект на рН върху остатъчната активност на имобилизираната HRP, в сравнение с остатъчната активност на свободната HRP при оптимално рН



фигура 1.7. Ефект на температурата върху остатъчната активност на имобилизираната HRP, в сравнение със свободната HRP при оптимална температура.

Промяна на оптималната температура от 25°C за свободната HRP до 35°C за CAB/PAMAM и 40°C за другите мембрани, потвърждава ефекта на предпазване на ензимната активност от мембраната (фигура 1.7).

TMOS/CAB/PAMAM и CAB/PAMAM показват най-високите кинетични параметри, следвани от другите мембрани (Таблица 1.2). И имобилизираната, и свободната HRP показват отговор на редукция на H₂O₂ с линеен диапазон от 3,4 µmol/L до 10,2 mmol/L. Получените стойности на K_m варират между 6,3×10⁻³М и 28,7×10⁻³М. Тези резултати показват, че имобилизираната HRP може да има по-голям афинитет към субстрата, в сравнение със свободната HRP.

Таблица 1.2. Кинетични параметри на свободната и имобилизирана HRP.

Проба	K _m [µM]	V _{max} , [µM/min]	R ²
CAP/PAMAM	10,23	2,99	0,828
MTES/CAP/PAMAM	28,7	5,43	0,977
CAB/PAMAM	6,33	6,25	0,891
MTES/CAB/PAMAM	12,14	5,72	0,981
TMOS/CAB/PAMAM	6,9	6,88	0,975

Оптимизиране на процесите

Изследвано е въздействието на използваната среда (фосфатен/ацетатен буфер) и стойността на рН върху ефективността на имобилизацията в границите от 3,0 до 9,0. Най-добра имобилизация има при фосфатния буфер при рН 7,0, следвана от ацетатния буфер с рН 7,0, докато при по-ниско рН се наблюдава по-ниска ефективност на имобилизацията.

Както е показано на фигура 1.8., най-високите нива на HRP са при мембраните с TMOS/CAB/PAMAM, след това CAB/PAMAM и накрая MTES/CAB/PAMAM.



Фигура 1.8. Количество свързан протеин при рН 7,0

Откриване на окисляеми съединения

За по-нататъшно изпитване на изградената система, откриването на някои окисляващи се съединения се състои в присъствието на H_2O_2 , използвайки мембраните с най-добра каталитична ефективност.

Каталитични свойства на свободна и имобилизирана HRP

Таблица 1.3 Каталитични свойства на свободна и имобилизирана HRP

проба	Абсолютно сухо тегло [mg/g]	Специфична активност [U/mg]	относителна активност [%]	Опт. pH	оптимална температура [°C]
Свободна HRP (фенол)	-	78,9	-	6,0	25 °C
Свободна HRP (Резорцинол)	-	49,2	-		
САВ/РАМАМ (фенол)	1,7	59	74	6,5	35 °C
САВ/РАМАМ (Резорцинол)		41,9	85		
ТМОС/САВ/РАМАМ (фенол)	2,1	71,3	90	6,0	40 °C
ТМОС/САВ/РАМАМ (Резорцинол)		45,3	92		

ТМОС/САВ/РАМАМ показват по-добри резултати, с отчетена най-висока относителната активност 90% и 92%, докато за САВ/РАМАМ относителната активност е 74% и 85% към фенол и резорцинол съответно (Таблица 1.3). ТМОС/САВ/РАМАМ са на по-високите нива на свързана HRP, последвани от САВ/РАМАМ, отчитайки съответно 2,1 мг и 1,7 мг свързан протеин на грам абсолютно сухо тегло.

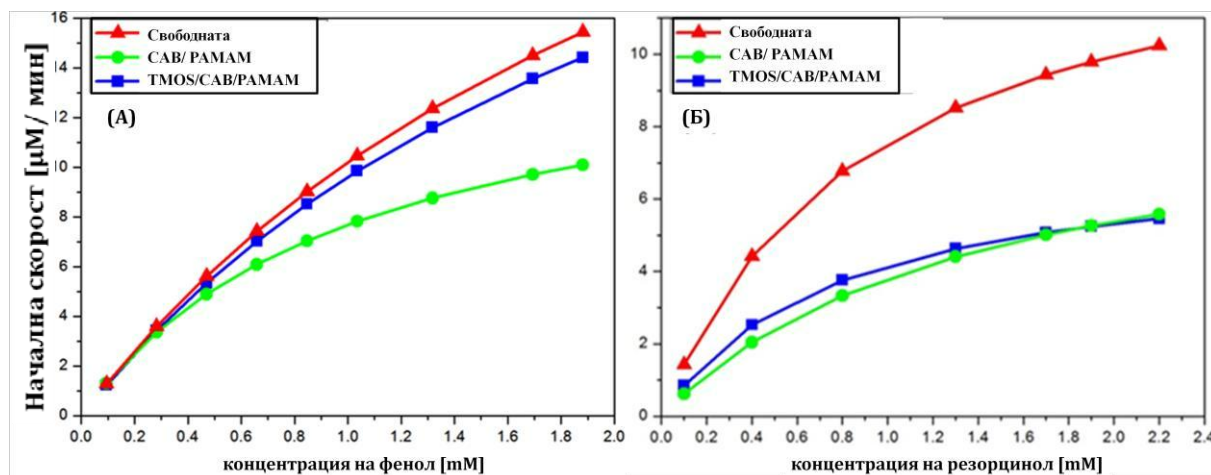
Таблица 1.4 показва кинетичните параметри на имобилизирана HRP, получените стойности на K_m варират между $0,76 \times 10^{-3}$ mM и $2,62 \times 10^{-3}$ mM.

таблица 1.4 Кинетични параметри на свободна и имобилизирана пероксидаза

Проба	K_m [μM]	V_{max} [μM/мин]	R^2
Свободна HRP (Резорцинол)	0,91	14,5	0,980
САВ/РАМАМ (фенол)	1,03	15,62	0,997
САВ/РАМАМ (Резорцинол)	1,38	9,09	0,989
ТМОС/САВ/РАМАМ (фенол)	2,46	33,33	0,993
ТМОС/САВ/РАМАМ (Резорцинол)	0,76	7,35	0,984

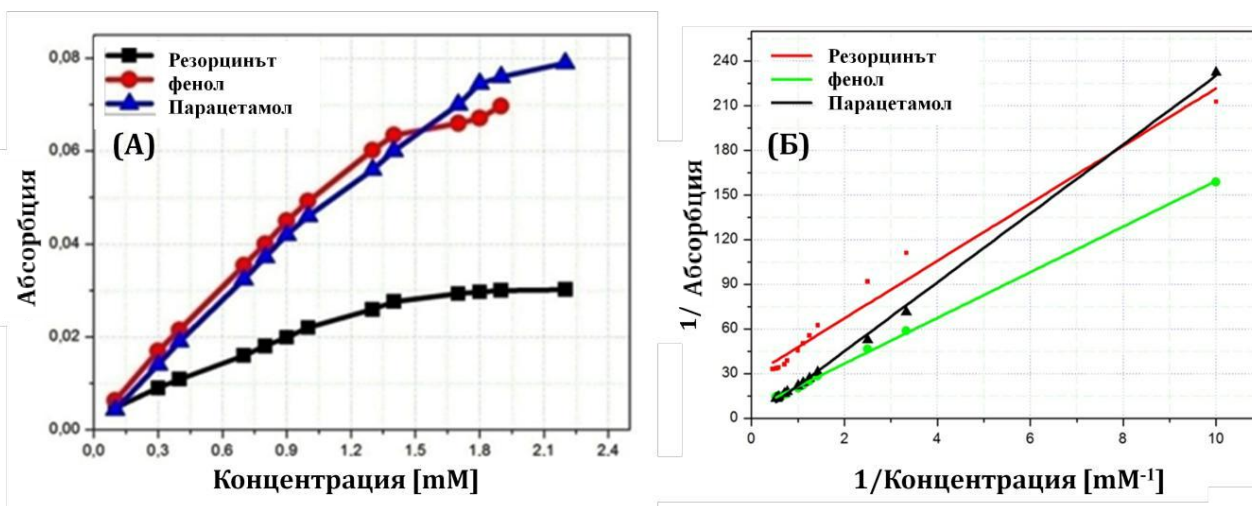
Зависимост от концентрациите на различни окисляеми съединения

Имобилизираната и свободна HRP показват отговор на намаляването на концентрациите на фенол и резорцинол с отчетен диапазон от 0,09 mM/L до 1,8 mM/L за фенол и от 0,1/L до 2,2 mM/L за резорцинол (фигура 1.9 а и 1.10 б)



фигура 1.9. Зависимост на скоростта на ензимно-катализираната реакция от концентрацията на субстрата - фенол и резорцинол.

Фигура 1.10 (А) показва зависимостта на абсорбцията при използване на имобилизирана HRP от концентрациите на различни окисляващи се съединения/ лекарства: ацетаминофен, фенол и резорцинол.



фигура 1.10. Зависимост на абсорбцията от концентрацията на резорцинол, фенол и ацетаминофен. Фигура (А) Абсорбция срещу С; (Б) 1/Абсорбция срещу 1/С.

Резултантното увеличение е линейно до 1.8 mM / L за ацетаминофен, 1.8 mM / L за резорцинол и 1.3 mM / L за фенол. На фигура 1.10. (Б) са показани също и съответните реципрочни участъци на константите $1/\text{Abs.}$ срещу $1/\text{C}$. Мекалис - 0.54 mM за резорцинол, 2.55 mM за фенол и 8.32 mM за ацетаминофен. Според тези

явни константи на Мекалис, се наблюдава следната тенденция по отношение на чувствителността : резорцин> фенол> ацетаминофен.

Матрици, синтезирани с модифициран подход

Този подобрен протокол е с оптимизирано добавяне на предварително приготвени SiO₂ частици с прецизен размер в наноинтервала в размер на около 3% W/W. Изградените хибридни матрици проявяват подобрени еднородност, гъвкавост, прозрачност и повърхностни свойства, които са желани качества за сензорно приложение, както и за ензимно имобилизиране.

Каталитични свойства на свободна и имобилизирана HRP

Както е показано в таблица 1.5, каталитичните свойства на имобилизираната HRP показват съизмерими стойности, в сравнение със свободната HRP. Това съответства и на предишните изследвания за CAB матрици с тяхната голяма повърхност и отворена структура в края.

TMOS/CAB/PAMAM(A) показва по-добри каталитични свойства, с най-висока отчетена относителна активност 94%, докато при TMOS/CAB/PAMAM(Б) относителната активност е 90%. От друга страна, при рН по-малко от 7.0 TMOS/CAB/PAMAM(A) и TMOS/CAB/PAMAM(Б) показват близки нива на свързаната HRP - съответно 2,48 мг и 2,5 мг свързан протеин на грам абсолютно сухо тегло.

Таблица 1.5. Каталитични свойства на свободния и имобилизирана HRP

Но.	проба	Абсолютн о сухо тегло [mg/g]	Специфич на активност [U/mg]	Относителна активност [%]	Опт. рН	Опт. температура [°C]
	Свободна HRP	-	31,7	-	6,0	30 °C
(A)	TMOS/CAB/PAMAM	2,48	29,8	94	6,5	40 °C
(Б)	TMOS/CAB/PAMAM	2,5	28,7	90	6,5	45 °C

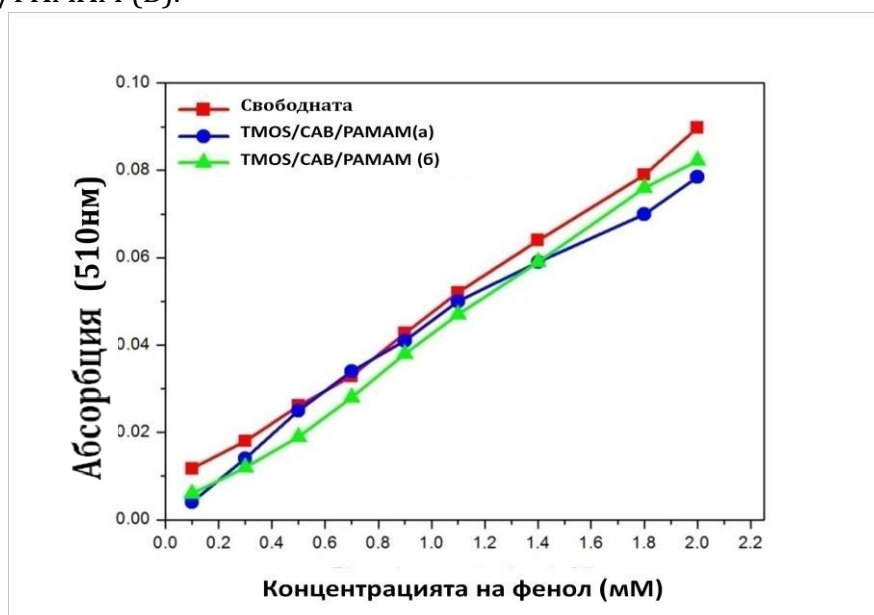
Засилените каталитични свойства и количеството свързан протеин може да се дължат на оптимизираното добавяне на наночастици SiO₂; SiO₂ действат като модифициращи повърхността молекули, които оптимизират образуването на по-фракциониран подслой с висока порьозност, което води до повишена скорост на проникване през мембраната, осигурявайки по-голяма повърхност за имобилизирането на по-голямо количество HRP и по-добро преминаване на субстрат в и на продукти извън мембраната, чрез намаляване на ограничението на субстратната дифузия, както и предлагайки по-висока защита от околната среда, което обяснява полученото увеличение на активността.

таблица 1.6 Кинетични параметри на свободна и имобилизирана пероксидаза

Проба	Km [μM]	Vmax [μM/min]	R ²
Свободна HRP	0,96	18,5	0,998
TMOS/CAB/PAMAM (а)	3,24	27	0,997
TMOS/CAB/PAMAM (б)	0,94	13	0,971

Таблица 1.6 представлява сравнение на кинетичните параметри на имобилизираната HRP с параметрите на свободната HRP. Използването на метода на Lineweaver-Burk за характеризиране на имобилизираната HRP, позволи изчисляването на константите на Michaelis и максималната скорост на реакцията. Иmobилизираната и свободната HRP дават отговор на намаляването на концентрацията на фенол с диапазон, отчетен от 0,09 mM / L до 2 mM / L за фенол. За имобилизираната и свободната HRP, стойностите, получени за K_t, варират между $0,94 \times 10^{-3}$ и $3,24 \times 10^{-3}$.

Фигура 1.11 показва зависимостта на стабилното състояние на имобилизирана HRP от концентрациите на фенол, увеличението, получено в отговор е линейно до 2,0 mM/L за свободната HRP, 1,4 mM/L за TMOS/CAB/PAMAM (A) и 2 mM/L за TMOS/CAB/PAMAM (Б).



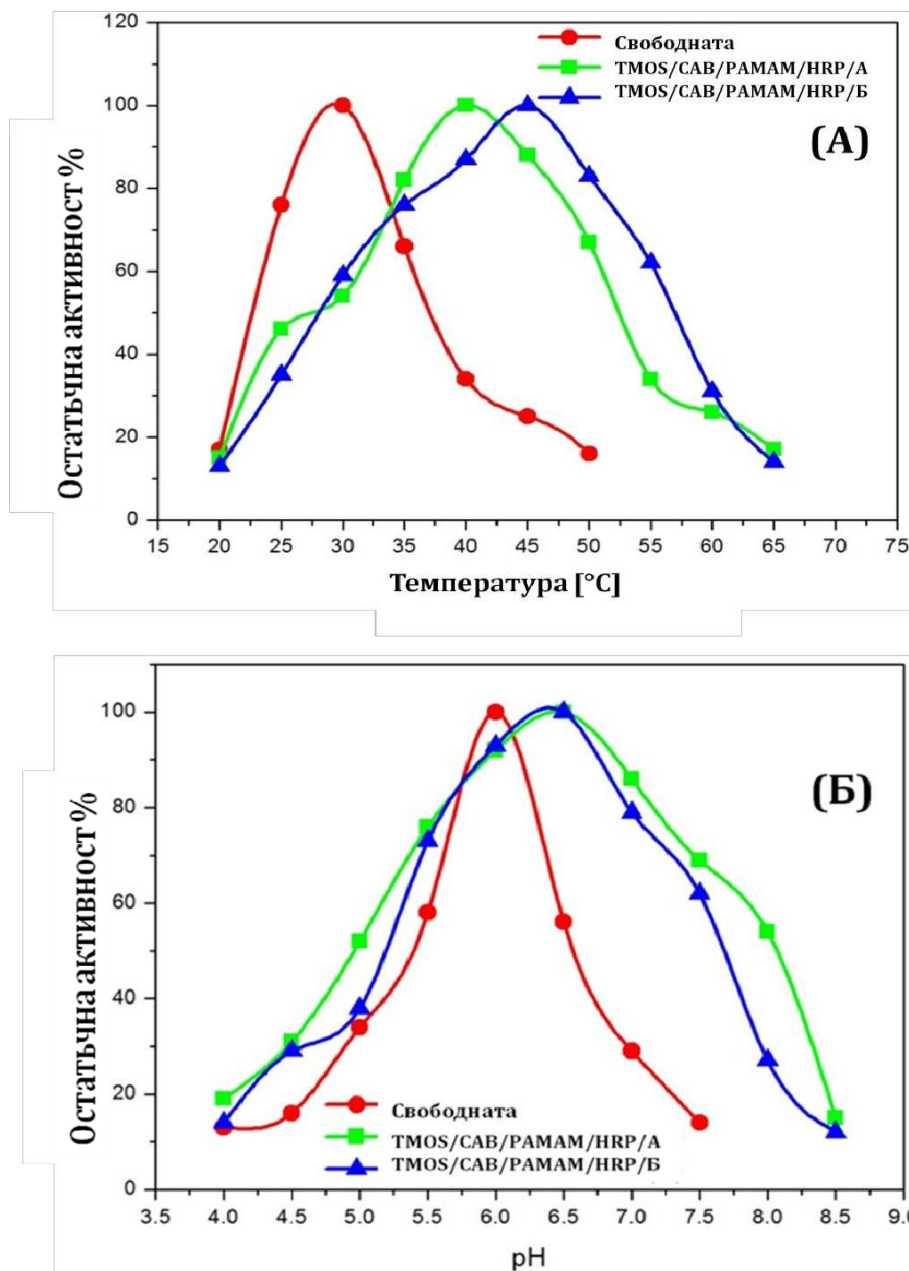
фигура 1.11 Зависимост на абсорбцията от концентрацията на фенол.

pH и температурен оптимум

Фигура 1.12 (а) показва остатъчната активност на свободна и имобилизирана HRP като функция от температурата. Резултатите показват висока термична стабилност на имобилизирана HRP върху двете матрици чрез изместване на оптимална температура от 30 °C за свободен HRP до 40 °C за TMOS/CAB/PAMAM/HRP/A и 45 °C в продължение на TMOS/CAB/PAMAM/HRP/Б.

Смята се, че матриците осигуряват по-добра околна среда и защита на HRP, която засяга температурния оптимум и ензимни стабилност.

Фигура 1.12 (б) показва оптимално оперативно рН, промяната в рН се отчита за двете матрици, които имат 100% остатъчна активност около рН 6.5, в сравнение с оптималната рН при свободна HRP, която е около 6.0. Кривите за имобилизираната HRP показват относително висока остатъчна активност в по-широк диапазон на рН.



фигура 1.12 (А) Ефект на температурата върху остатъчната активност на имобилизираната HRP, в сравнение със свободната HRP при оптимална температура, (Б) Ефект на рН върху остатъчната активност на имобилизираната HRP, в сравнение с остатъчната активност на свободната HRP при оптимално рН.

Измерванена парацетамол

Мембрани на базата на TMOS/CAB/PAMAM, съдържащи оптимизирани SiO₂ частици се инкубират в ацетатен буфер в продължение на 24 часа преди имобилизиране и се сравняват с не-инкубирани мембрани по отношение на определянето на ацетаминофен.

таблица 1.7 Каталитични свойства на свободна и имобилизирана HRP

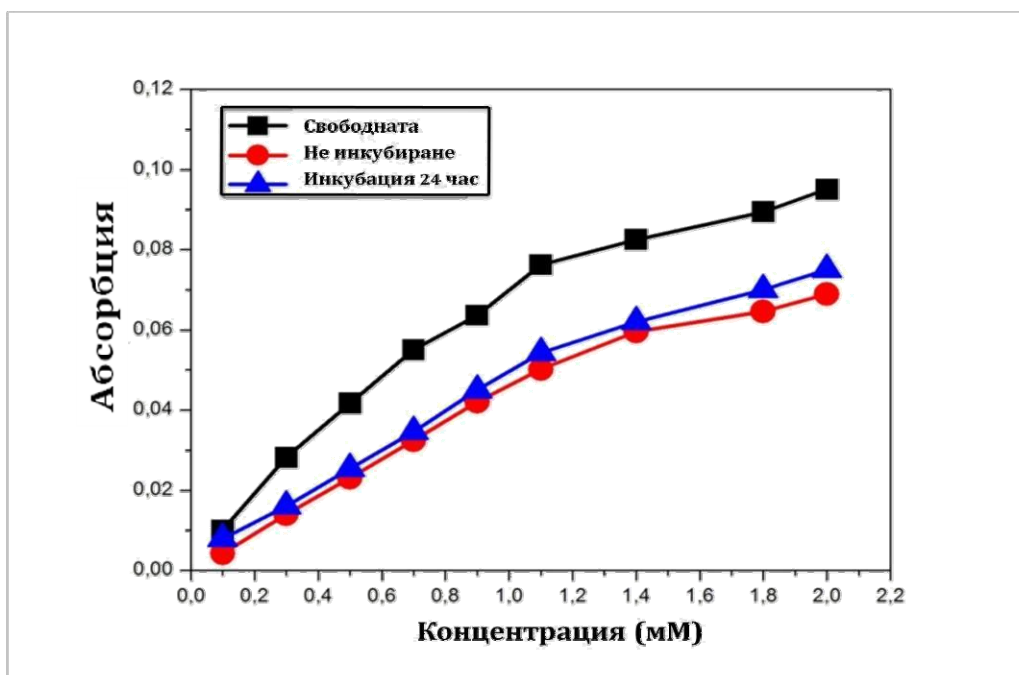
Проба	Абсолютно сухо тегло [mg/g]	Специфична активност [U/mg]	Относителна активност [%]	Опт. pH	Опт. температура [°C]
Свободна HRP	-	55,5	-	6,0	25 °C
TMOS/CAB/PAMAM (не инкубирани)	1,69	37,2	67	6,5	40 °C
TMOS/CAB/PAMAM (инкубирани 24 ч)	2,4	28,6	52	6,5	40 °C

Както е показано в таблица 1.7 и таблица 1.8, каталитичните свойства на обездвижен HRP върху хибридни мембрани (Инкубирани и не-инкубирани), базирани на TMOS/CAB/PAMAM са сравнени с каталитичните свойства на свободната HRP.

таблица 1.8 Кинетични параметри на свободна и имобилизирана пероксидаза

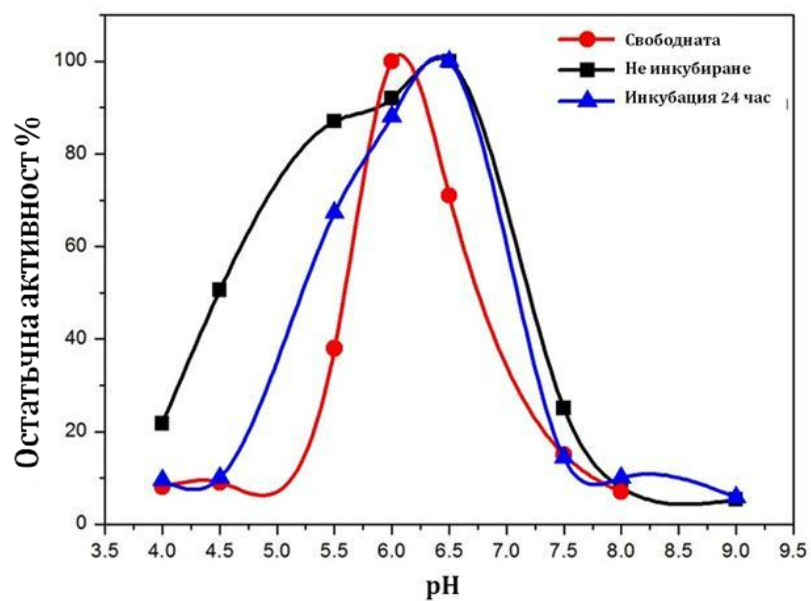
Проба	Km [μM]	Vmax [μM/мин]	R ²
Свободна HRP	3,13	43,5	0,999
TMOS/CAB/PAMAM (не инкубирани)	2,64	40	0,980
TMOS/CAB/PAMAM (инкубирани 24 ч)	5,3	43,4	0,982

Фигура 1.16 показва зависимостта на абсорбцията при свободна и обездвижена HRP (имобилизирана върху инкубирани и не инкубирани мембрани) от концентрациите на парацетамол. Полученото в резултат увеличение е линейно до 0,75 mM/L свободна HRP, 1,4 mM/L за HRP имобилизирана върху неинкубирани мембрани и 1,1 mM/L за инкубирани мембрани.

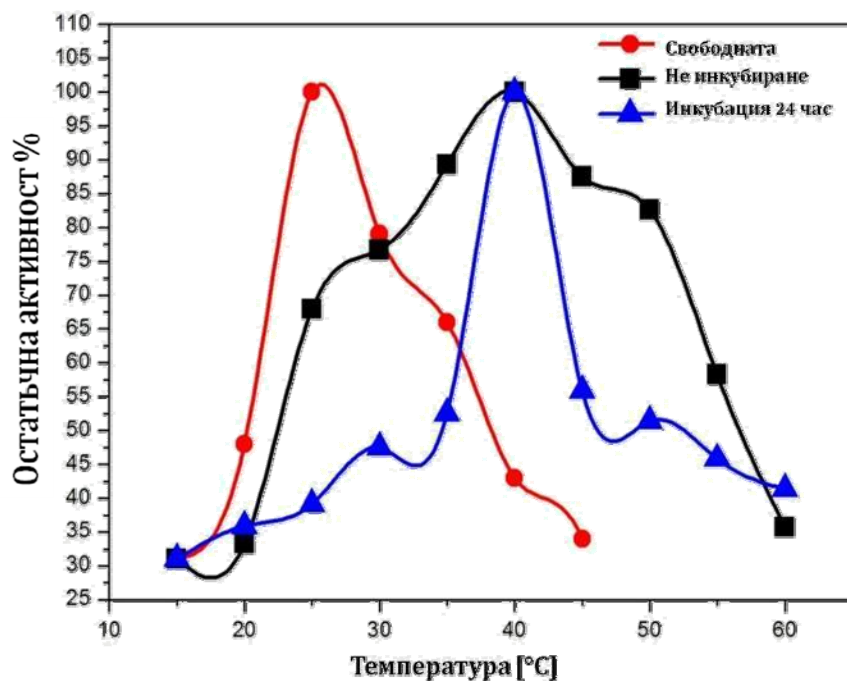


фигура 1.13 Зависимост на абсорбцията от концентрацията на ацетаминофен.

Оптимална температура и рН



фигура 1.14 Ефект на рН върху остатъчната активност на HRP при стайна температура.

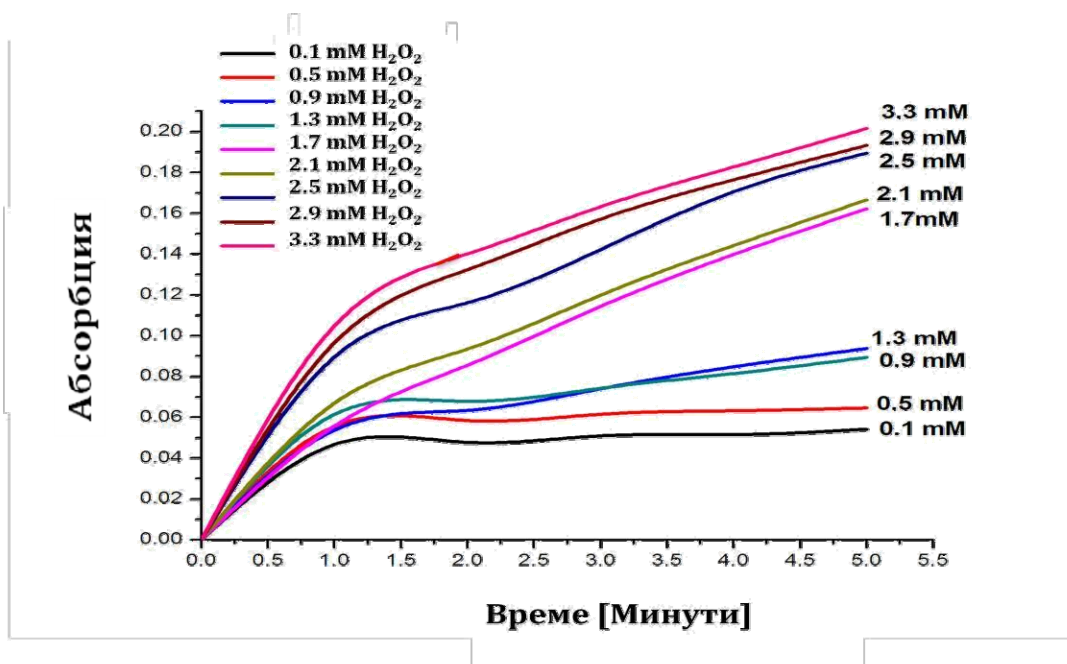


Фигура 1.15 Температурният ефект върху остатъчната активност на имобилизираната HRP при pH 6.0.

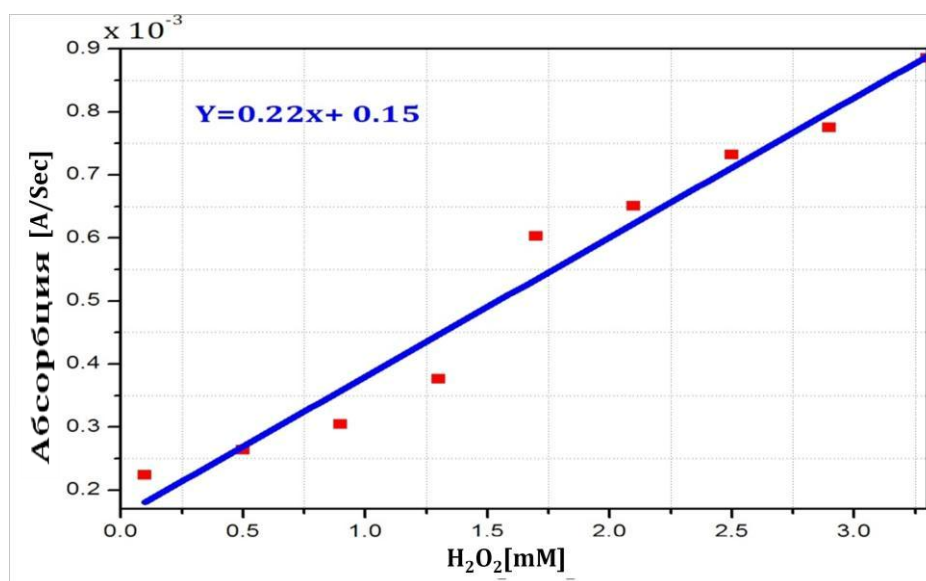
Параметри и характеристики на оптичния биосензор

Статистически анализ

Тъй като бе установено, че най-добрите хибридни мембрани с най-висока специфична активност за HRP са съставени от TMOS с САВ/Н и РАМAM, тази хибридна мембрана е избрана за изграждане на оптичния биосензор. След изграждането на биосензора, първата стъпка е да се изследва чувствителността му към H_2O_2 и след това към други субстрати. Кривите при различни концентрации на H_2O_2 , кривите време-отговор на биосензора при излагане на различни концентрации на H_2O_2 са показани на фигура 1.16, 1.18, 1.20.

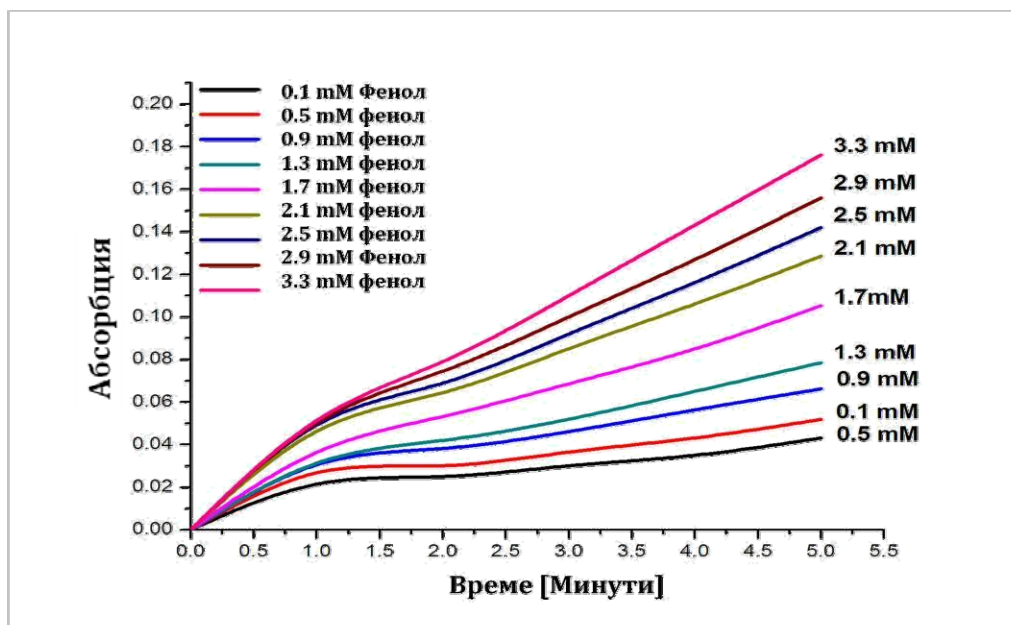


фигура 1.16 Време за реакция за различните концентрации на H_2O_2 , получени чрез видимия биосензор с оптично влакно (при 460 нанометра), основани на имобилизирана HRP.

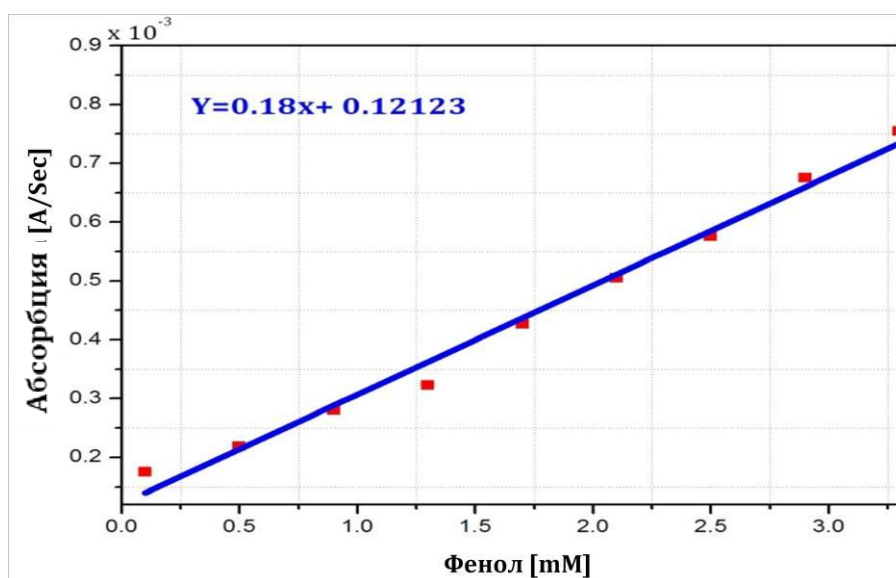


Фигура 1.17 Крива на калибриране за различни концентрации H_2O_2 , получени чрез видимия биосензор с оптично влакно (при 460 нанометра), основани на имобилизирана HRP.

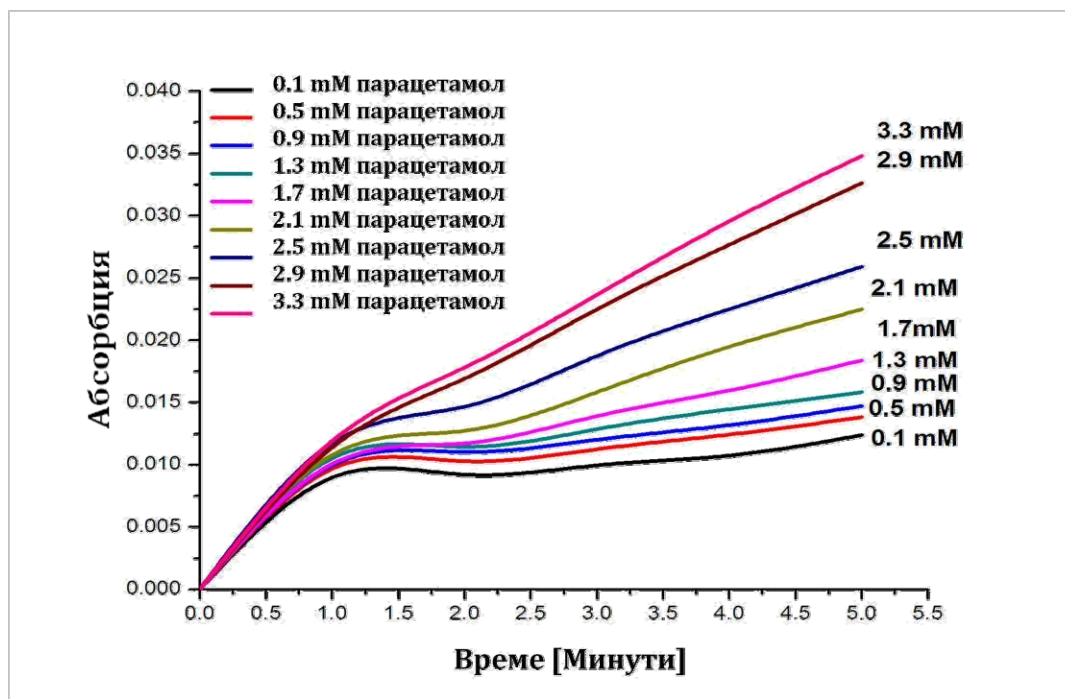
В зависимост от концентрацията на субстрата, времето за реакция на оптичния биосензор е около 60 s в контакт със статичното състояние и оперативната стабилност е 35 дни. Работният обхват на субстрата варира от $1,1 \cdot 10^{-3}$ М до $3,3 \cdot 10^{-3}$ М. Измерванията се повтарят по 6 пъти за всяка концентрация.



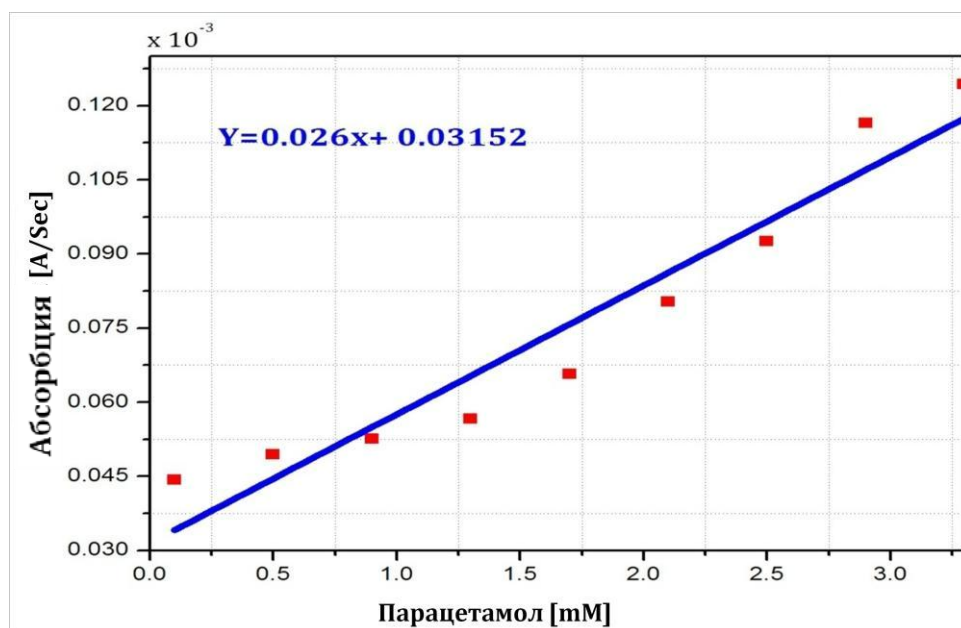
фигура 1.18 Време за реакция за различните концентрации на H_2O_2 , получени чрез видимия биосензор с оптично влакно (при A510 нанометра), основани на имобилизирана HRP.



Фигура 1.19 Крива на калибриране за различни концентрации H_2O_2 , получени чрез видимия биосензор с оптично влакно (при A510 нанометра), основани на имобилизирана HRP.



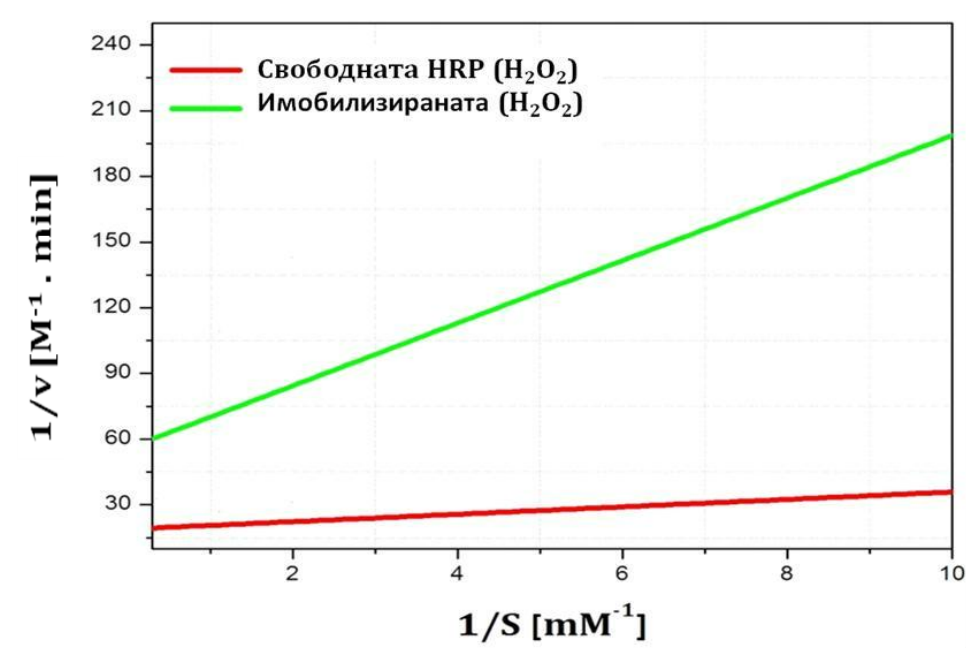
фигура 1.20 Време за реакция за различните концентрации на парацетамол, получени чрез видимия биосензор с оптично влакно (при А510 нанометра), основани на имобилизирана HRP.



Фигура 1.21 Крива на калибриране за различни концентрации ацетаминофен, получени чрез видим биосензор с оптично влакно (при- А510 нанометра), основано на имобилизирана HRP.

Таблица 1.9 Параметри и характеристики на оптичния биосензор, синтезиран от имобилизирана HRP.

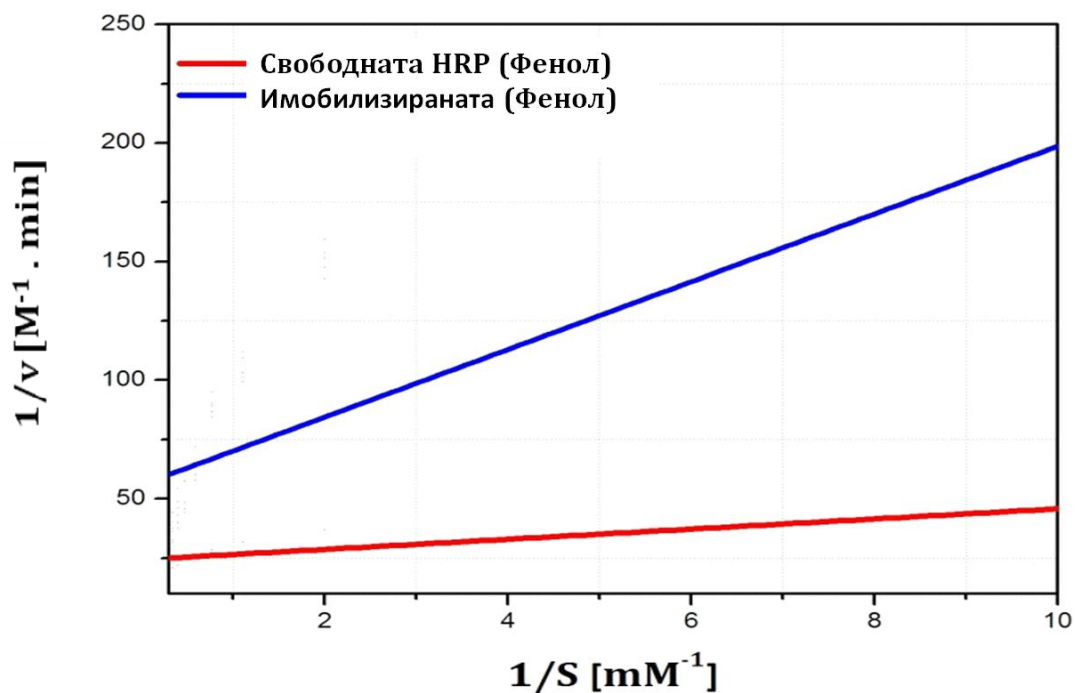
Параметър	Оптичен биосензор
Линеен отговор на HRP, М	$0,1 \cdot 10^{-3} - 3,3 \cdot 10^{-3}$
Стабилност, дни	35
Време за реакция, s	60



Фигура 1.22 Кинетика на свободна и имобилизирана HRP с различни концентрации на H_2O_2 .

Таблица 1.10 Кинетични параметри на свободна и имобилизирана пероксидаза с различни концентрации на H_2O_2 .

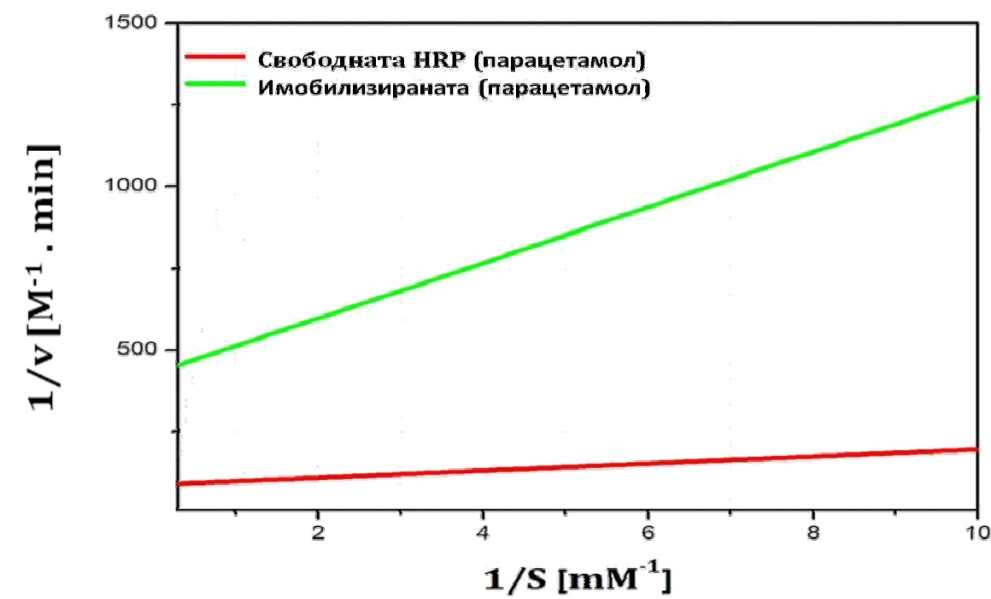
проба	Свободна HRP	имобилизирана
$v_{\max}$ [$\mu\text{M}/\text{мин}$]	52,82	17.91
k_m [μM]	8,94	25.59



фигура 1.23 Кинетика на свободна и имобилизирана HRP с различни концентрации на фенол.

Таблица 1.11 Кинетични параметри на свободна и имобилизирана пероксидаза с различни концентрации на фенол.

проба	Свободната HRP	имобилизирана
$v_{\max}$ [$\mu\text{M}/\text{мин}$]	41,01	18.13
k_m [μM]	8,79	27.97



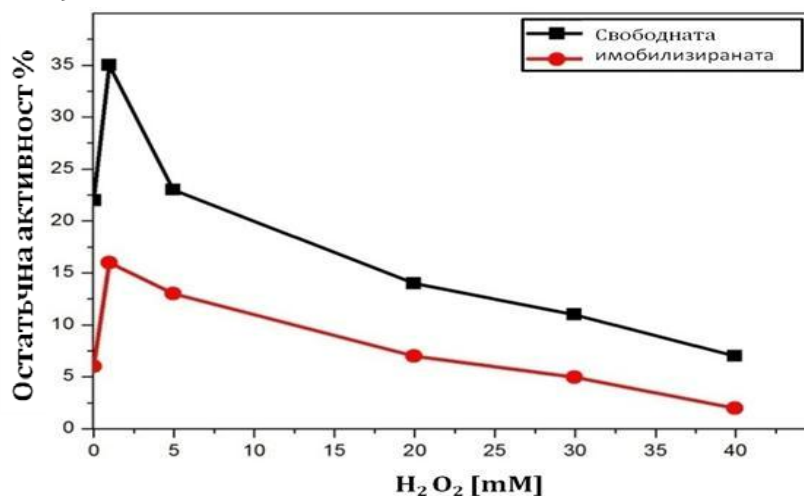
фигура 1.24 Кинетика на свободна и имобилизирана HRP с различни концентрации на парацетамол.

Таблица 1.12 Кинетични параметри на свободна и имобилизирана пероксидаза с различни концентрации на парацетамол.

Проба	Свободната HRP	имобилизирана
$V_{\max}$ [$\mu\text{M}/\text{мин}$]	11,55	2.28
k_m [μM]	12,57	29.56

Устойчивост на водороден пероксид

За изследването на устойчивостта на H_2O_2 е изследвана свободна и имобилизирана HRP активност с различни концентрации на H_2O_2 (50 μM до 40 mM) (Фигура 1.25)



Фигура 1.25. Устойчивост на свободна и имобилизирана HRP на H_2O_2

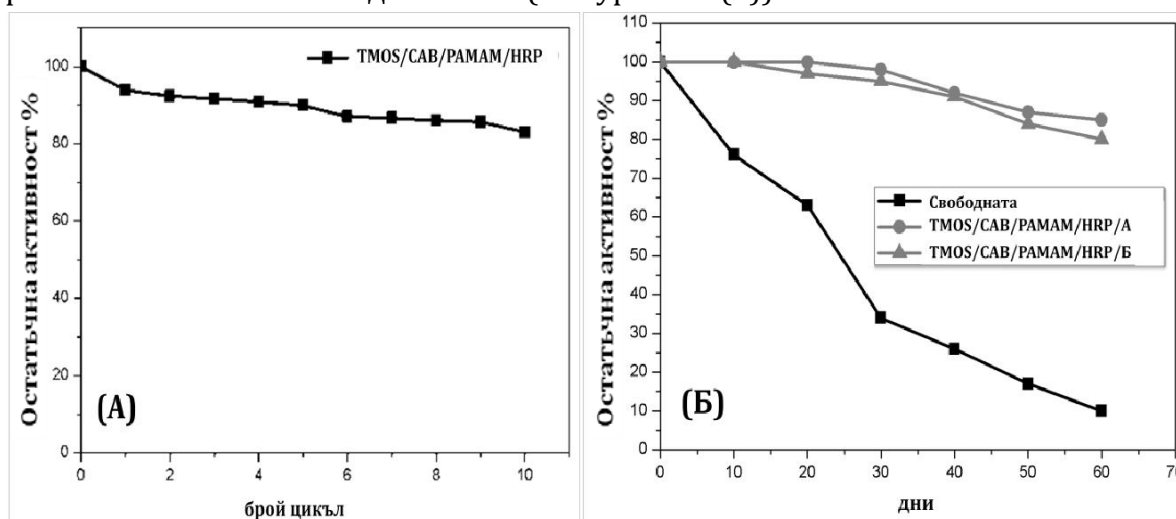
Стабилност

Многократно използване

Резултатите показват, че имобилизираната HRP запазва около 80% от първоначалната ензимна активност след 10 последователни цикли на приложение, което показва, че имобилизираната HRP е с подходяща стабилност и може да се използва повече от един път (фигура 1.26 (а)).

Стабилност на съхранение

Остатъчна активност, запазена от имобилизираната HRP (60 дни след ензимната имобилизация) е около 85% в сравнение със свободната HRP, която задържа около 10-15% от първоначалната активност след този период. Резултатите показват, че стабилността на съхранение на имобилизирана HRP е по-добра в сравнение с тази на свободната HRP (Фигура 1.26 (б)).



фигура 1.26. Максималната активност запазена спрямо (а) брой цикли, (б) период на съхранение.

Поведение при сушене

Използваните силикатни нано-пълнители оказват въздействие върху ускоряването на процеса на сушене, като се избягва свиване и влошаване на мембраните; Сушенето се извършва при 25-28 °C за една нощ с краен остатъчен разтворител по-малко от 10%.

Число на Дамкьолер(Да)

Число на Дамкьолер(Да) се изчислява за различни субстрати, както следва,

Таблица 1.13 Изчислени число на дамкьолер и Степента на превръщане на субстрата

Субстрат	Da	Степент на превръщане на субстрата (X)	X (%)
H ₂ O ₂	7,142857	0,877193	88 %
Фенол	6,085924	0,858875	86 %
Парацетамол	1,180321	0,541352	54 %

За H₂O₂

Стойност на Da = 7,1429,

Това означава, че работата на нашия биосензор е над кинетичния контрол и не се постига контрол на масопреноса за нативните субстрати.

Степента на превръщане на субстрата е X = 88%.

Може да се приеме, че съществува високастепен на превръщане.

За фенол

Стойност на Da = 6,0859,

Това означава, че работата на нашия биосензор е над кинетичния контрол и не се постига контрол на масовия трансфер.

Степента на превръщане на субстрата е X = 86%.

Може да се приеме, че съществува високастепен на превръщане.

За парацетамол

Стойност на Da = 1,1803,

Това означава, че работата на нашия биосензор е над кинетичния контрол и не се постига контрол на масовия трансфер.

Степента на превръщане на субстрата е X = 54%.

Може да се приеме, че съществува добрастепен на превръщане.

Таблица 1.14 Сравнение на различни видове HRP биосензори, докладвани от други автори.

Тип на биосензор	Линеен отговор (М)	Опт. рН	Оптимална температура [°C]	Стабилност (дни)	Лит.
Covalent Immobilization of Peroxidase onto Hybrid Membranes for the Construction of Optical Biosensor (Our work)	$3.4 \cdot 10^{-6} - 0.2 \cdot 10^{-3}$	6.5	35 °C - 40°C	35	1
Design of optical biosensors for detection of pharmaceutical products. (Our work)	$0.1 \cdot 10^{-3} - 1.4 \cdot 10^{-3}$ And $0.1 \cdot 10^{-3} - 2.0 \cdot 10^{-3}$	6.5	40 °C - 45 °C	35	2
Design of optical biosensor based on enzyme immobilization for determination of oxidizable drugs. (Our work)	$0.1 \cdot 10^{-3} - 1.8 \cdot 10^{-3}$ And $0.1 \cdot 10^{-3} - 1.3 \cdot 10^{-3}$ And $0.1 \cdot 10^{-3} - 2.2 \cdot 10^{-3}$ And $0.1 \cdot 10^{-3} - 1.7 \cdot 10^{-3}$	6.0- 6.5	35 °C - 40°C	35	3
Investigation of the Properties of Immobilized HRP on Magnetic Particles	-	7.0	30°C	-	4
Immobilization of chemically modified HRP within activated alginate beads	-	8.0	25°C	5	5
Electrochemical Biosensor Based on HRP for the Determination of Oxidizable Drugs	$0.001 \cdot 10^{-3} - 9 \cdot 10^{-6}$ (Acetaminophen), $0.001 \cdot 10^{-3} - 6 \cdot 10^{-6}$ (resorcinol)	-	25°C	12	6
Application of immobilized HRP for removal and detoxification of azo dye from aqueous solution	-	7.4	50°C	-	7
Co-immobilization of peroxidase and tyrosinase onto hybrid membranes obtained by the sol-gel method for the construction of an optical biosensor.	-	5.0- 6.5	30-35°C	-	8

Optimization of HRP Immobilization on Glassy Carbon Electrode Based on Maize Tassel-Multiwalled Carbon Nanotubes for Sensitive Copper(II) Ion Detection	$0.01 \cdot 10^{-3} - 0.5 \cdot 10^{-3}$ 3	7.0	25°C	18	9
HRP-Carrying Electrospun Nonwoven Fabrics for the Treatment of o Methoxyphenol	-	6.0	40 °C	5	10
Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Horseradish Peroxidase Immobilized in a DNA/Chitosan-Fe ₃ O ₄ Magnetic Nanoparticle Bio-Complex Film	$0.002 \cdot 10^{-3} - 0.1 \cdot 10^{-3}$ 3	7.0	25°C	7	11
Stacked films immobilization of MBTH in nafion/sol-gel silicate and horseradish peroxidase in chitosan for the determination of phenolic compounds.	$0.01 \cdot 10^{-3} - 0.07 \cdot 10^{-3}$	7.0	-	60	12

Литературни източници към таблица:

- [1] Yotova L., Hassaan A., Yaneva S., 2015, Int. Journal of Bioautomation, vol. 19, p.177-186.
- [2] Hassaan A., Yaneva S., Yotova L., 2015, Bulgarian Chemical Communications journal, vol. 47, no. 1, p. 445–451.
- [3] Hassaan A., Yaneva S., Yotova L., Betcheva R., 2015, First National Conference of Biotechnology, Bulgaria, vol. 100, p. 144-153.
- [4] Yotova L., Ivanov T., Mironova V., Chuchuranova V., 2008, International Journal Bioautomation.;11(1), p. 65-72.
- [5] Dragica S., Miloš P., Olivera P., Marilen G. P., Ksenija R., Radivoje P., 2014, Hem. Ind. Vol. 68 (1), p. 117–122.
- [6] Arzum E., Aysun P., Burcu M., Kagan K., Mehmet Ö., 2000, Turk J Med Sc, p. 349-354.
- [7] Fathollah G.-B., Amir H. M., Simin N., Mohammad A. F., Ramin N. and Mahmood A. M., 2011, vol 15, iss. 2.
- [8] Yotova L., Yaneva S., Marinkova D. & Serfaty S., 2013, Vol. 27, Issue 3,p. 3885-3889.
- [9] Mambo M., Jonathan O. Okonkwo, Nana M. Agyei, 2014.
- [10] Chao P., Ran D., Li D., Jing W., and Yucai H., 2014.
- [11] Tingting G. *, Jianli Wang, Hongqi Xia, Si Wang and Xiaoting Yu, 2014, *Materials*, vol. 7(2), p. 1069-1083.
- [12] Jaafar A., Musa A., Lee Y. Heng, Nadar A. Karuppiah, Ham I Sidek, 2006, Anal Bioanal Chem.; 386(5): p.1285-92.

ИЗВОДИ

От нашите изследвания, можем да заключим, че полученият биосензор предлага добра чувствителност и възпроизводимост на измерванията, получените нови нано хибридни мембрани и метод за имобилизация са успешно реализирани.

1. За първи път стана възможно, използвайки зол-гел метод да се изградят трикомпонентни хибридни матрици, с повишена гъвкавост и прозрачност за ефективна ензимна имобилизация, с участието на силициеви прекурсори (неорганични) и производни на целулозата (органични).

1.1. TMOS/CAB/PAMAM и CAB/PAMAM мембрани показват най-добри резултати в сравнение с другите синтезирани мембрани. Най-висока относителна активност е записана от TMOS/CAB/PAMAM и CAB/PAMAM мембрани съответно с 58% и 62%.

2. Определено е определи оптималното съотношение между условията на реакцията за получаване на мембраните (според влиянието на редица фактори като количеството на добавения силициев диоксид, времето, методът за получаване, върху морфологичните и структурни промени в крайните материали).

3. Подобряване на получаването на хибридни мембрани, с използването на предварително подготвени наночастици SiO_2 възможно чрез:

3.1. Оптимизирано добавяне на предварително приготвени SiO_2 частици с точен размер в наноинтервала в размер на около 3% v/v. Това подобрява свойствата на мембраните, ефективността на имобилизацията, както и получената каталитичната активност при свързването на SiO_2 в целулозните мембрани, образувайки водородни връзки (свързване на органични и неорганични фази) при намаляване на градиентите на вътрешното налягане по време на процеса на сушене.

3.2. Относителната активност при мембрани, синтезирани с помощта на предварително подготвени наночастици SiO_2 достига 94% и 90% с някои субстрати.

4. Установи се възможността за оптимизирането на условията на имобилизация, за достигане на най-високото количество на имобилизиран HRP ензим и доказването, че HRP успешно се имобилизира върху хибридни мембрани.

5. Разработен е оптичен биосензор с широк спектър на приложимост, проследяващ токсични съединения и лекарства като фенол и парацетамол.

6. Различните мембрани с имобилизиран ензим показват различни каталитични активности, сравнени един с друг и със свободния ензим.

- 6.1. Наблюдава се по-добра имобилизация върху мембрани, съдържащи САВ; предполага се, че това се дължи на повишената порьозност, отворената структура и съответно по-високата налична площ за по-голямо количество имобилизиран ензим, докато намаляват дифузионните ограничения и така се подобрява каталитичната активност.
- 6.2. Количеството имобилизирана HRP се увеличава с около 25-35%, при инкубиране на мембраните за 24ч. преди момента на имобилизация.
7. Използването на PAMAMs повлиява неорганичния процес на кондензация-полимеризация и на зол-гел материала, резултатът на което са полимерни мембрани със свойства, подходящи за имобилизация.
8. Мембраните с имобилизиран HRP се използват за определяне на различни съединения, подлежащи на окисление и фармацевтични продукти. Откриването на тези съединения с окисляеми групи (OxG); например OH, NH, SH, като фенол и резорцинол е направено в присъствието на H₂O₂.
 - 8.1. Резултатите показват, че относителната активност отчетена за САВ/PAMAM и TMOS/САВ/PAMAM е съответно 74% и 90% при откриване на фенол и съответно 85% и 92% за резорцин.
9. Получената биокатализаторна система показва оперативна стабилност, около 80% от първоначалната ензимната активност се запазва след 10 последователни цикъла на прилагане и около 85% от първоначалната ензимната активност се запазва 60 дни.

Списък с публикациите по дисертационния труд

- [1] A. Hassaan, S. Yaneva, L. Yotova, R. Betcheva, “Design of optical biosensor based on enzyme immobilization for determination of oxidizable drugs”, First National Conference of Biotechnology, Bulgaria, vol. 100, pp. 144-153 (2015).
- [2] A. Hassaan, S. Yaneva, L. Yotova, “Design of optical biosensors for detection of pharmaceutical products”, Bulgarian Chemical Communications journal, vol. 47, no. 1, pp. 445–451 (2015).
- [3] L. Yotova, A. Hassaan, S. Yaneva, “Covalent immobilization of peroxidase onto hybrid membranes for the construction of optical biosensor”, Int. Journal of Bioautomation, vol. 19, pp.177-186 (2015).

Участия в научни семинари и конференции

- [1] The scientific poster session for young scientists- 2014, University of Chemical Technology and Metallurgy, Sofia, Bulgaria.
- [2] Nanoscience advances in CBRN agents detection, Information and energy security, 29 May – 6 June, 2014, Sozopol, Bulgaria.
- [3] V-th National Crystallographic Symposium NCS2014, 25-27 September, University of Chemical Technology and Metallurgy, Sofia, Bulgaria.
- [4] First National Conference of Biotechnology, 17-18 October 2014, Sofia University, Sofia, Bulgaria.