



ХИМИКОТЕХНОЛОГИЧЕН И МЕТАЛУРГИЧЕН УНИВЕРСИТЕТ

ФАКУЛТЕТ ПО ХИМИЧНО И СИСТЕМНО ИНЖЕНЕРСТВО

КАТЕДРА „БИОТЕХНОЛОГИЯ”

инж. Спаска Атанасова Янева

БИОСЕНЗОРИ ЗА ФЕНОЛ И ДОПАМИН

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

на дисертация

за придобиване на образователната и научна степен „доктор”

по научна специалност 5.11 Биотехнологии

(Биоорганична химия, химия на природните

и физиологично активните вещества)

Научен ръководител:

проф. д-р инж. Любов Йотова

Научно жури:

1. проф. д-р инж. Емилия Найденова, председател и рецензент

2. член кор. проф. дбн Иван Иванов, рецензент

3. проф. дбн Диана Петкова

4. проф. д-р инж. Любов Йотова

5. доц. д-р инж. Николай Стоянов

София, 2013

Дисертационният труд е написан на 115 страници и съдържа 66 фигури и 26 таблици. Цитирани са 191 източника. Номерата на фигурите и таблиците в автореферата не съответстват на тези в дисертацията. Резултатите са отразени в 4 научни публикации и са докладвани на 13 научни форума.

Представеният дисертационен труд е обсъден и приет на защита на заседание на разширен научен съвет на научното звено на катедра „Биотехнология” при ХТМУ-София, състояло се на 01.07.2013 г.

Публичната защита на дисертационния труд ще се проведе на 14.10.2013 г. от 14 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.

Издавам най-сърдечна благодарност, дълбоко уважение и признателност към научния ми ръководител проф. д-р инж. Любов Йотова за търпението, помощта, подкрепата, придобитите знания и умения при изработването и оформянето на дисертационния труд. Благодаря за ценните съвети, мотивацията, споделените креативни идеи, и за предоставената възможност да работя по тази тематика.

Сърдечно благодаря на проф. д-рн Цветан Велинов от Физическия факултет на Софийския университет за помощта и съветите при съвместната ни ползотворна работа.

Списък на съкращенията в дисертацията

AA	съполимер на акриламид/акрилонитрил
CAB	целулозен ацетат бутират
CAP/H	целулозен ацетат пропионат с висока молекулна маса
CAP/L	целулозен ацетат пропионат с ниска молекулна маса
DMF	N,N - диметилформамид
ETMS	етилтриметокси силан
GOD	глюкозооксидаза
IEP	изоелектрична точка
LbL	техника за нанасяне на покрития слой по слой (layer-by-layer)
L-DOPA	L-3,4-дихидроксифенилаланин
LOD	праг на чувствителност
MTES	метил триетокси силан
POD	пероксидаза
QCM	кварцово кристална микровезна
R.S.D.%	относително стандартно отклонение
SEM	сканиращата електронна микроскопия
spin-coating	метод за получаване на покрития чрез центробежно отливане
SPR	повърхностен плазмонен резонанс
TEOS	тетраетокси силан
TMOS	тетраметокси силан

Въведение

През последните години се наблюдава завишен контрол на води, въздух, почви, храни, лекарства и козметика. Причина за това са високите нива и голямото разнообразие на ксенобиотици в околната среда, както и различните пътища за постъпването им в живите организми. Това налага намирането на нови методи за анализ и контрол на тези съединения. Разбирането на механизмите на действие на ксенобиотиците и тяхното определяне е ключов фактор за преодоляване на редица екологични проблеми.

Конструирането на биосензори е мултидисциплинарна наука, която съчетава постиженията на технологиите и познанията в същността на биотехнологичните и биологични процеси. Намирането на „идеалния“ биосензор е предизвикателството, пред което са изправени сравнително нови техники за анализ като SPR, QCM и други, с цел по-доброто разбиране на процесите, протичащи на молекулно ниво.

Успешното изучаване действието на ензимите в живите организми дава възможност тези биохимични катализатори ефективно да се прилагат за конструирането на биосензори. Използването на разтворими ензими е свързано с трудности, произтичащи от

невъзможността да бъдат регенерирани – затруднение, което се преодолява чрез свързването им към подходящи носители.

Зол-гелните технологии позволяват получаването на подходящи носители, приложими за разнообразни техники на имобилизация на различни класове ензими.

Настоящото изследване е насочено към създаване на нов биосензор с оптични влакна, на основата на ковалентно имобилизирана тирозиназа върху новосинтезирана група хибридни мембрани. Изследвани са факторите, оказващи влияние на взаимодействието ензим/носител, които са ключови за успешното конструиране и дълъг период на експлоатация на всеки биосензор.

Потенциалното приложение на новоконструираните биосензори е за определяне на фенолни съединения и допамин в реални проби като отпадъчни води, храни и козметика.

Цел и задачи на дисертационния труд

Целта на настоящата дисертационна работа е конструиране на оптични биосензори за определяне на фенол и допамин, на основата на имобилизирани моно и двуензимни системи, върху получени по зол-гелен метод хибридни мембрани.

За изпълнение на поставената цел, бяха формулирани следните конкретни задачи:

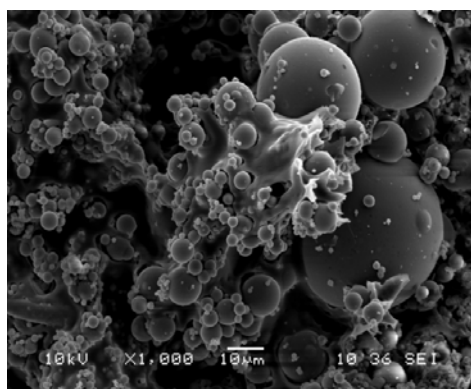
1. Зол-гелен синтез на нови трикомпонентни силиций съдържащи органично-неорганични материали.
2. Имобилизация на моделни ензими – глюкозооксидаза и пероксидаза и изследване на каталитичните им свойства.
3. Имобилизация на тирозиназа и сравнение на каталитичните свойства спрямо различните носители.
4. Конструиране на оптичен биосензор с имобилизирана тирозиназа.
5. Конструиране на оптичен биосензор с двуензимна система – тирозиназа/пероксидаза.
6. Изследване с оптичен биосензор потенциалното инхибиторно действие спрямо тирозиназа на новосинтезирани белтъчни производни на галантамин.

Резултати

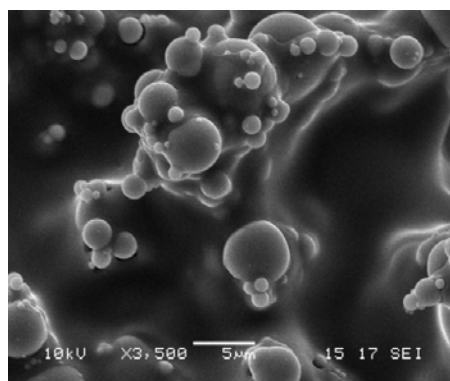
1. **Синтез по зол-гелен метод на нови хибридни мембрани на основата на TEOS и TMOS. Имобилизация на моделни ензими – GOD и POD и изследване на каталитичните им свойства. Конструиране на амперометричен биосензор.**

1.1. Характеристика на получените по зол-гелен метод хибридни мембрани

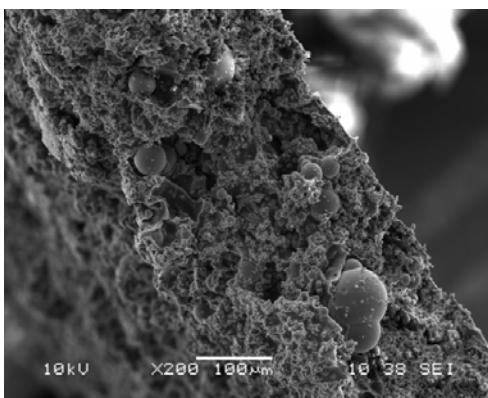
Получените по зол-гелен метод хибридни мембрани са прозрачни, пластични и механично устойчиви. На фигура 1 е представена повърхността на хибридна трикомпонентна мембрана на основата на TMOS/CAB/AA.



а



б



в

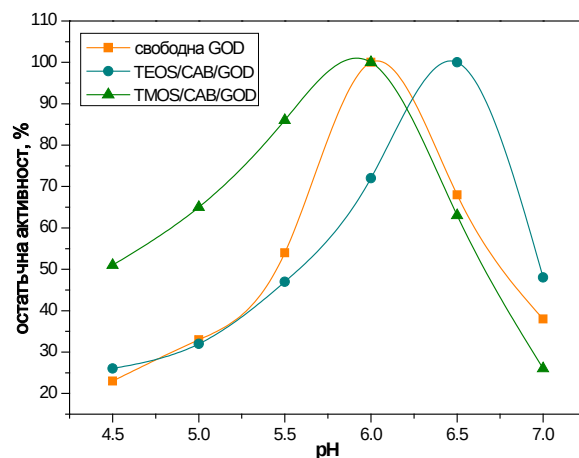
Фиг.1. SEM изображения на хибридна мембрана на основата на TMOS/CAB/AA при различни увеличения (а, б). Изображение на напречен лом на хибридна мембрана (в).

При получената матрица се наблюдава разнообразна топология. На повърхността на мембраната и във вътрешността ѝ се наблюдават сфери с правилна форма и размери от 1 до 100 μm . Частиците с размер от порядъка на 1 μm представляват сфери от SiO_2 . Наличието на органични компоненти в структурата на матрицата спомага за формирането им. Също така се наблюдава втори вид сфери с размери до 100 μm , които са образувани от включения целулозен ацетат бутират. Дебелината на изследваната мембрана е от порядъка на 300 μm . На същата фигура (в) е представен напречен лом на хибридна мембрана. Структурата е силно порьозна, което вероятно се дължи на частично регенериране (деацетилиране) на целулозния ацетат в условия на киселинна хидролиза. Наличието на пори е предпоставка за безпрепятственото проникване на субстрата през мембраната.

1.2. Характеристика на имобилизираните глюкозооксидаза и пероксидаза

■ Глюкозооксидаза

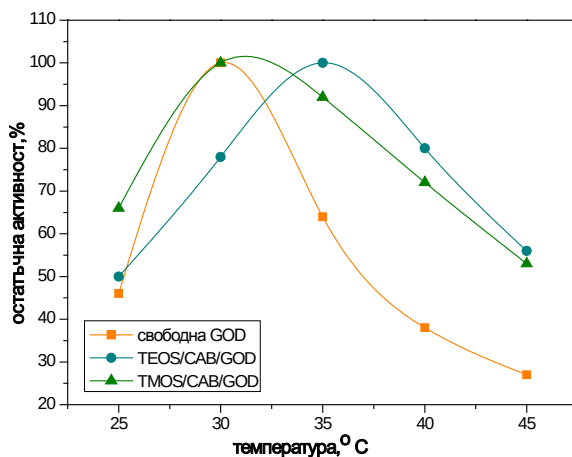
Изследването за биосъвместимост на новите матрици е проведено с моделен ензим – глюкозооксидаза. След предварително окисление на въглехидратните остатъци е извършена ковалентна имобилизация. рН оптимумите на имобилизирана и свободна глюкозооксидаза са определени в диапазон 4,5 – 7,0. На фиг. 2 са представени рН профилите за свободна и имобилизирана глюкозооксидаза.



Фиг.2. Влияние на рН върху активността на свободна и имобилизирана GOD върху хибридни мембрани на основата на TEOS/CAB/AA и TMOS/CAB/AA.

За свободна GOD рН оптимумът е установен при рН=6, което съответства на литературните данни. За мембрана, съдържаща TEOS/CAB/AA се наблюдава типичното поведение за имобилизирани ензими - разширяване на рН профила и относително висока остатъчна активност при рН = 5,5 – 85%. За мембраната, съдържаща TMOS/CAB/AA се наблюдава отместване до рН=6,5, като профила на кривата е идентичен на този за свободна GOD.

Температурният оптимум на свободния и свързан ензим са определени в диапазон 25° – 45° С. На фигура 3 са представени температурните профили на свободния и свързан ензим.



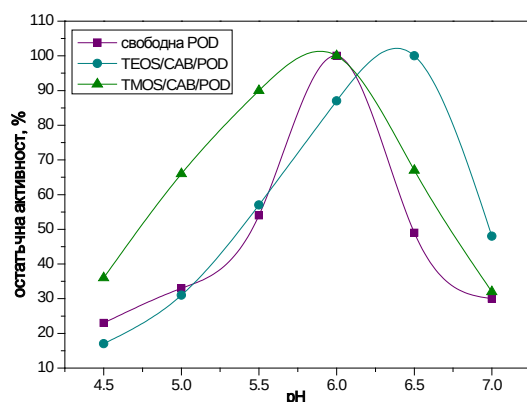
Фиг.3. Влияние на температурата върху активността на свободна и имобилизирана GOD върху хибридни мембрани на основата на TEOS/CAB/AA и TMOS/CAB/AA.

За свободния ензим температурният оптимум е установен при 30°C, което съвпада с литературните данни. Имобилизираният ензим върху матрицата на TEOS/CAB/AA има разширен диапазон на оптимума в границите 30 – 40 °C с над 75 % остатъчна активност. Оптимумът за GOD върху този носител е установен при t= 35°C. Температурният оптимум

за носители, съдържащи TMOS/CAB/AA е при 30°C, като се наблюдава разширяване на температурната крива.

▪ Peroксидаза

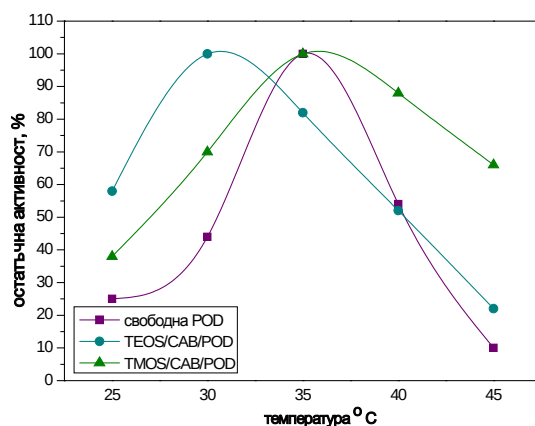
За втори моделен ензим е избрана пероксидаза, изолирана от хрян. Изследвано е поведението на имобилизираната пероксидаза. Оптимумите за пероксидаза са определени в диапазон 4,5 –7,0. Получените рН профили са представени на фигура 4. Оптимумът за свободна POD е определен при рН=6,0, което съвпада с цитираните резултати в литературата. При имобилизирана POD върху матрици, съдържащи TEOS/CAB/AA се наблюдава отместване на минимума до рН=6,5. Оптимумът за POD, имобилизирана върху матрица на основата на TMOS/CAB/AA показва висока остатъчна активност – над 65% в диапазон на рН=5,0-6,5 и съвпада с този за свободния ензим. Прави впечатление, че профилите на кривите за имобилизирана POD са близки до тези за имобилизирана GOD.



Фиг.4. Влияние на рН върху активността на свободна и имобилизирана POD върху хибридна мембрана на основата на TEOS/CAB/AA и TMOS/CAB/AA.

Температурните оптимуми са определени в диапазон 25⁰ – 45⁰С . На фигура 5 са представени температурните профили на свободния и свързан ензим.

Оптимумът за свободна POD е определен при t =35°C. Идентични са стойностите за оптимума на POD, имобилизирана върху мембрани, съдържащи TMOS/CAB/AA - 35°C. Наблюдава се широк профил на рН кривата за матрица, съдържаща TMOS/CAB/AA. Определени са високи стойности на относителна активност от 70% за t=30° С до 85% за t=40°C. Материалите, съдържащи TMOS/CAB/AA проявяват температурен оптимум при t= 30°C и 80% остатъчна активност при t=35°C. При сравнение на температурните профили с тези за GOD се наблюдава сходство. Това е показателно за параметрите на матриците, приложени за имобилизация на моделните ензими. Резултатите от изследването показват, че свойствата на новите биокаталитични системи по отношение влиянието на рН и температура зависят от вида на силициевия прекурсор.



Фиг.5. Влияние на температурата върху активността на свободна и имобилизирана POD върху мембрана на основата на TEOS/CAB/AA и TMOS/CAB/AA.

В таблица 1 са представени обобщените данни за каталитичните свойства на свободна и свързана глюкозооксидаза и пероксидаза към хибридни мембрани.

Таблица 1. Каталитични свойства на ензими, ковалентно свързани към хибридни мембрани.

ензими	носител	спец. акт. (U/mg)	отн. акт. (%)	свързан ензим (mg/g абс.сух носител)	pH опт.	тем.опт. (°C)
GOD	-	6,47	-	-	6,0	30
имобилизирана GOD	TEOS/CAB	2,36	36,48	1,25	6,5	35
	TMOS/CAB	5,83	90,11	1,42	6,0	30
POD	-	33,88	-	-	6,0	35
имобилизирана POD	TEOS/CAB	10,69	31,55	0,74	6,5	30
	TMOS/CAB	19,39	57,23	1,09	6,0	35

Ковалентно свързаните ензими към хибридна мембрана, съдържаща TMOS/CAB/AA запазват рН и температурния си оптимум на действие. При имобилизиране на ензимите към хибридни мембрани, съдържащи TEOS/CAB/AA се наблюдава изместване на рН и температурния оптимум. Стойностите за специфична активност, относителна активност и количество свързан ензим показват, че мембраните, съдържащи TMOS/CAB/AA са с по-добри параметри. В таблица 2 е направено сравнение между кинетичните параметри на полиамидна мембрана и хибридна мембрана, съдържаща TMOS/CAB/AA/GOD.

От началните скорости на реакцията и при нарастващи субстратни концентрации (0.2-20 mM) спектрофотометрично са определени константите K_m .

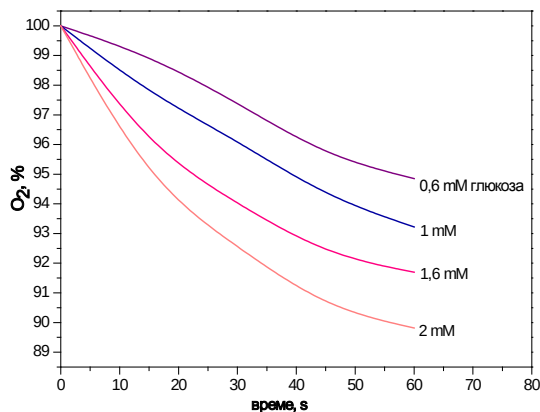
Таблица 2. Кинетични параметри на свободна и имобилизирана глюкозооксидаза.

носител	ензим	K_m	V_m	R^2
TMOS/CAB	GOD	$4,5 \times 10^{-6}$ M спрямо субстрат O_2	$86,953 \times 10^{-6}$ M/mg.min	0.98623
полиамидна мембрана	GOD	$1,09 \times 10^{-6}$ спрямо субстрат O_2	$40,12 \times 10^{-6}$ M/mg.min	0.90133
-	свободна GOD	$15,54 \times 10^{-3}$ M	0,065 M/mg.min	0.9837

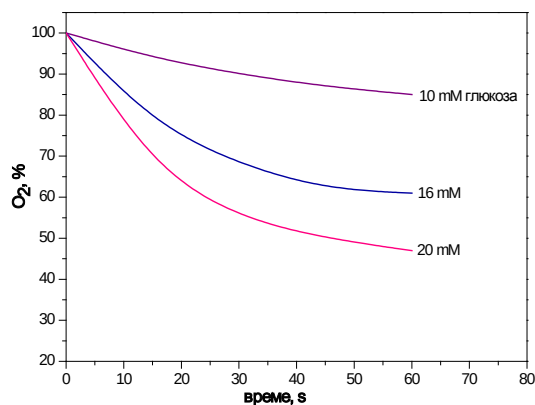
Резултатите от изследването показват, че работните параметри на новосинтезираните мембрани са сравними с тези получени за полиамидни мембрани.

1.3. Измервания с амперометричен биосензор, модифициран с мембрана на основата на TMOS/CAB/AA

По spin-coating метод са получени тънки мембрани, съдържащи TMOS/CAB/AA. Проведени са измервания с амперометричен сензор за кислород. Към сензора е прикрепена хибридна мембрана с имобилизирана GOD. Съгласно стандартите за количество разтворен кислород в течности, 100% отговарят на 5 mg/L O_2 . На фигури 6 и 7 са представени резултатите от измерванията при различни концентрации на глюкоза.



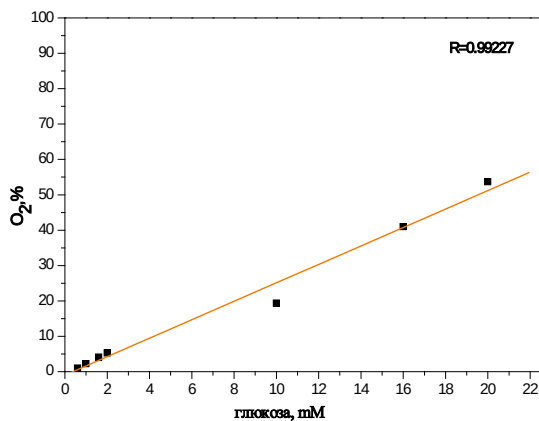
Фиг.6. Време за отговор на ензимен електрод, снабден с хибридна мембрана на основата на TMOS/CAB/AA/GOD при ниски концентрации на глюкоза.



Фиг.7. Време за отговор на ензимен електрод, снабден с хибридна мембрана на основата на TMOS/CAB/AA/GOD при високи концентрации на глюкоза.

Резултатите от измерванията показват, че времето за отговор на сензора се намира в интервал от 15 до 30 секунди, в зависимост от субстратната концентрация.

Измерванията с биосензора са възпроизводими до десетия ден. Получените стойности могат да послужат за изготвяне на стандартна права за субстрат – глюкоза.



Фиг.8. Стандартна права за глюкоза.

Основните характеристики на амперометричния биосензор на основата на хибридна мембрана, съдържаща TMOS/CAB/AA/GOD са посочени в таблица 3.

Таблица 3. Характеристики на биосензор с хибридна мембрана.

вид мембрана	субстрат	линеен диапазон	R^2	време живот (дни)	време за отговор (s)
хибридна мембрана TMOS/CAB	глюкоза	0,6 – 20mM	0,99227	10	15-60

Времето за отговор на ензимния електрод е определено от 15 до 60 секунди, в зависимост от субстратните концентрации при широк линейен диапазон. Коефициентът на корелация показва добра линейна зависимост между отделните измервания в посочения диапазон от субстратни концентрации. Времето за възстановяване на ензимния електрод след всяко измерване е 2 минути.

2. Синтез на група трикомпонентни хибридни мембрани с различни целулозни производни. Изследване на мембраните с POD. Имобилизация на тирозиназа. Конструирание на оптичен биосензор с имобилизирана тирозиназа. Конструирание на оптичен биосензор с мултиензимни системи – тирозиназа/POD.

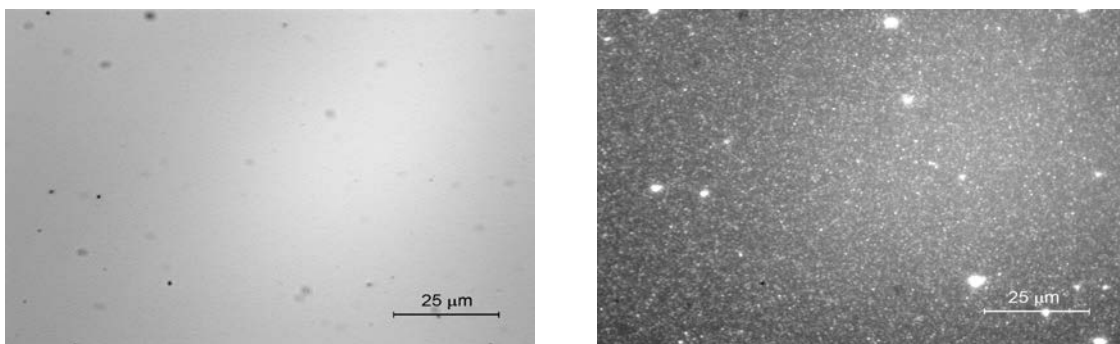
2.1. Характеристика на получените по зол-гел метод хибридни мембрани

Следващият етап от нашите изследвания е насочен към синтез на втора група хибридни мембрани, съдържащи силициев диоксид, целулозни производни и съполимер на акриламид/акрилонитрил. В това изследване освен TEOS и TMOS са включени още два прекурсора – ETMS и MTES.

- | | |
|-----------------|-----------------|
| ✓ TEOS/CAP/H/AA | ✓ TEOS/CAP/L/AA |
| ✓ TMOS/CAP/H/AA | ✓ TMOS/CAP/L/AA |
| ✓ ETMS/CAP/H/AA | ✓ ETMS/CAP/L/AA |
| ✓ MTES/CAP/H/AA | ✓ MTES/CAP/L/AA |

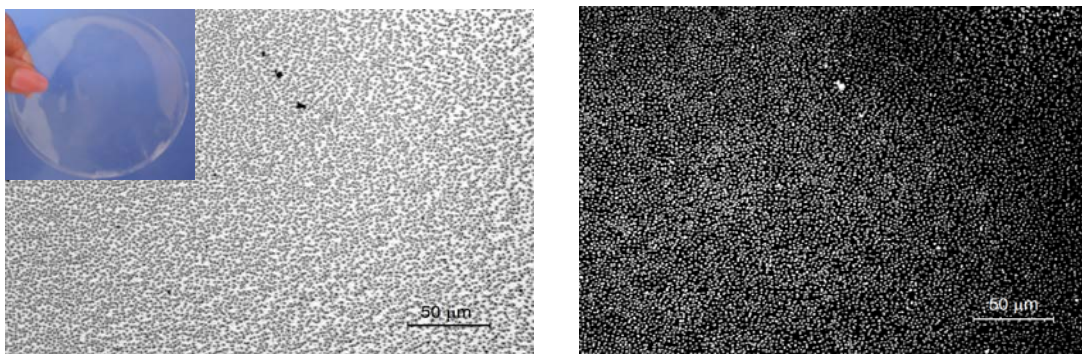
Целулозният ацетат бутират от предходното изследване е заменен с целулозни производни – целулозен ацетат пропионат с ниска и висока молекулна маса. Във всички хибридни мембрани е включен съполимер на акриламид/акрилонитрил, като носител на функционални групи. Количествата и условията на синтез са идентични на предходните експерименти с TEOS/CAB/AA и TMOS/CAB/AA. Всички получени мембрани са в различна степен прозрачни, пластични и механично устойчиви. На фигурите по-долу са представени изображения на мембраните, наблюдавани с оптичен микроскоп и заснети със CCD камера в режим на тъмно и светло поле.

Мембраната от съполимер на акриламид/акрилонитрил е гладка, прозрачна, с малки пори, неравномерно разпределени по повърхността (фиг.9). Поради слабия контраст на полимерната мембрана е приложен режим на тъмно поле, който позволява да се видят ясно границите на микро порите. Въпреки установената гладка повърхност на светло поле, при тъмно поле се наблюдава зърнеста структура във вътрешността на мембраната, което дава представа за типа на вътрешната полимерната организация. При нехомогенни структури съпоставянето на изображенията при светло и тъмно поле позволява да се определят обектите, които поглъщат и които разсейват светлината.



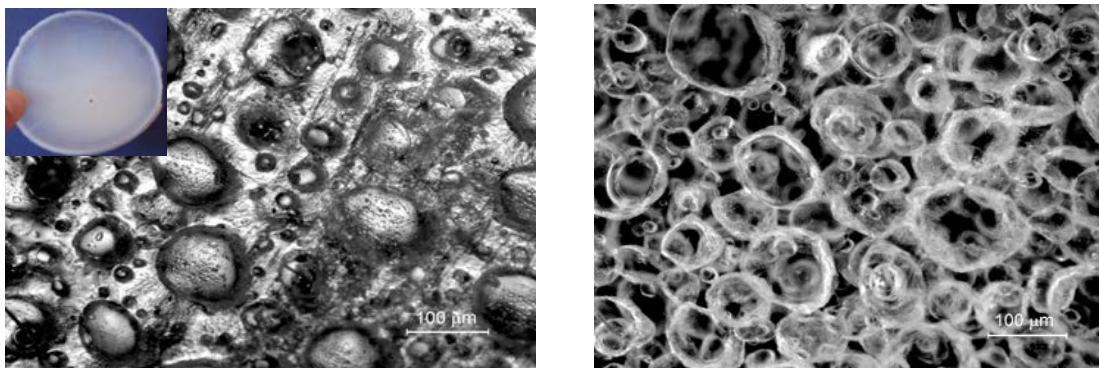
Фиг.9. Изображение с оптичен микроскоп на мембрана, съдържаща АА, при числена апертура $NA = 0,8$ в светло поле (от ляво) и тъмно поле (от дясно).

На фигура 10 е представена повърхността на мембрана, съдържаща CAP/H и АА. Изображенията показват, че полимерът е равномерно разпределен в целулозната матрица, а големината на частиците варира от 0,5 до 1 μm. Целулозният ацетат бутират се явява подложка-носител за полимерните частици, които са разпределени на повърхността на мембраната и формират зърнеста структура. Това позволява функционалните групи от полимера да се свързват безпрепятствено с окислените въглехидратни остатъци на ензима.



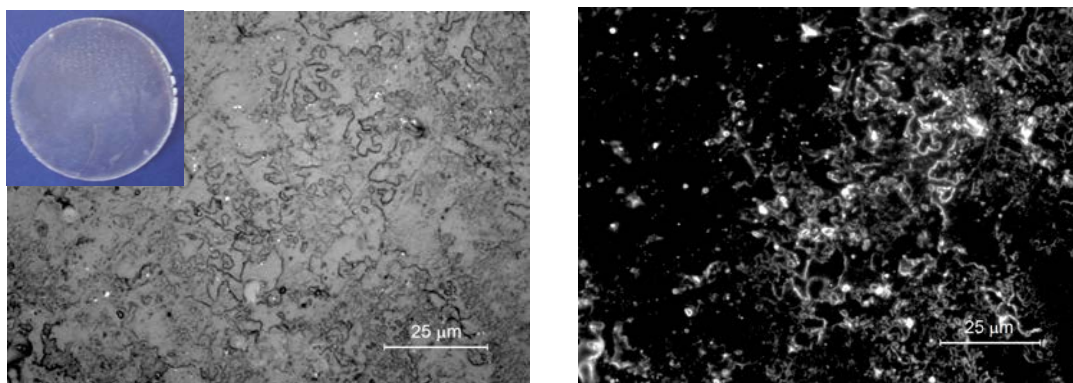
Фиг.10. Изображение с оптичен микроскоп на мембрана, съдържаща АА/CAP/H, при числена апертура $NA = 0,4$ в светло поле (от ляво) и тъмно поле (от дясно). В левия ъгъл – фотографска снимка на мембраната.

На фигура 11 е представено изображение на повърхността на хибридна мембрана, съдържаща TEOS/CAP/H/AA. Повърхността на мембраната е силно порьозна с плътно разположени агрегати с размери от 1 до 100 μm. Повърхността на хибридните мембрани, съдържащи TMOS/CAP/H/AA е идентична на тази с TEOS/CAP/H/AA.



Фиг.11. Изображение с оптичен микроскоп на мембрана, съдържаща TEOS/CAP/H/AA, при числена апертура $NA = 0,2$ в светло (от ляво) и поле тъмно поле (от дясно). В левия ъгъл – фотографска снимка на мембраната.

На фигура 12 е представено изображение на хибридни мембрани на основата на ETMS/CAP/H/AA.

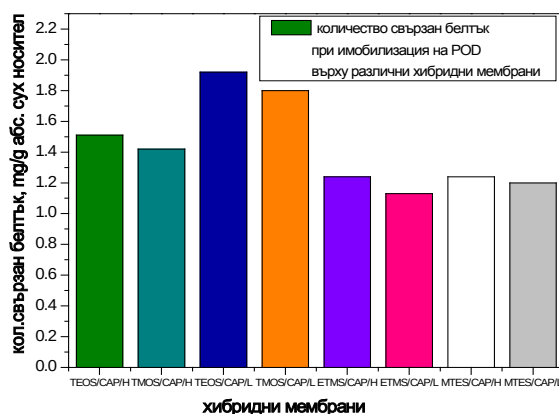


Фиг.12. Изображение с оптичен микроскоп на мембрана, съдържаща ETMS/CAP/H/AA, при числена апертура $NA = 0,8$ в светло (от ляво) и тъмно поле (от дясно). В левия ъгъл – фотографска снимка на мембраната.

При този тип мембрани се наблюдава наличие на микропори, неравномерно разпределени по повърхността, което е благоприятен фактор за безпрепятственото проникване на субстрата.

2.2. Характеристика на имобилизираната пероксидаза

След окисление на въглехидратните остатъци, POD е имобилизирана върху синтезираните по зол-гел хибридни мембрани. Определено е количеството свързан белтък спрямо грам абсолютно сух носител. На фигура 13 графично са представени количествата свързан белтък към различните носители.



Фиг.13. Количество свързан белтък към хибридните мембрани, синтезирани по зол-гел метод.

Резултатите от графиката показват най-високи стойности на свързан ензим към мембрани, съдържащи TEOS/CAP/H/AA, TMOS/CAP/H/AA, TEOS/CAP/L/AA и TMOS/CAP/L/AA.

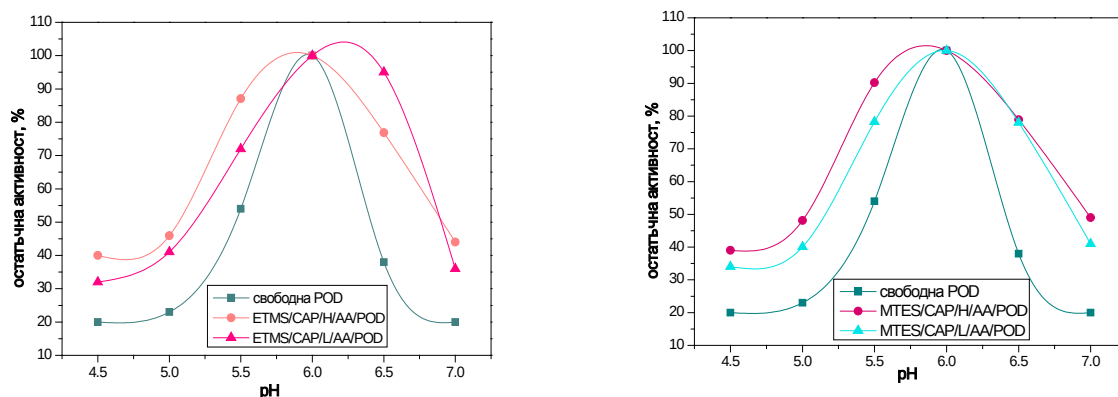
Получените резултати за специфична и относителна активност на мембраните, съдържащи TEOS/CAP/H/AA, TMOS/CAP/H/AA, TEOS/CAP/L/AA и TMOS/CAP/L/AA се оказват незадоволителни. Въпреки високите стойности на свързания ензим се наблюдава ниска специфична и относителна активност. Причина за това може да бъде хетерогенната структура и наличието на големи количества агрегати с различни размери, което възпрепятства равномерното проникване на субстрата през мембраната. Също така са възможни дифузионни ограничения от самата матрица, поради наличието на големи количества агрегати в структурата ѝ. За останалите изследвания са включени матрици, съдържащи ETMS/CAP/H/AA, ETMS/CAP/L/AA и MTES/CAP/H/AA, MTES/CAP/L/AA.

В таблица 4 са обобщени каталитичните свойства на имобилизирана пероксидаза към хибридни мембрани на основата на ETMS и MTES с целулозен ацетат пропионат с ниска и висока молекулна маса и съполимер на акриламид/акрилонитрил.

Таблица 4. Каталитични свойства на свободна и имобилизирана пероксидаза.

мембрана	кол-во свързан белтък [mg/g]	специфична активност U/mg	относителна активност [%]	pH оптимум	темп. оптимум [°C]	K_m [M]
свободна POD	-	5,9	-	6.0	25	$1.9 \cdot 10^{-3}$
ETMS/CAP/H/AA	1.24	2,9	50.29	5.0	25	$5.0 \cdot 10^{-3}$
MTES/CAP/H/AA	1.24	2,8	47.66	5.0	25	$6.3 \cdot 10^{-3}$
ETMS/CAP/L/AA	1.13	2,08	35.32	6.5	45	$6.9 \cdot 10^{-3}$
MTES/CAP/L/AA	1.20	2,32	39.37	5.0	45	$5.7 \cdot 10^{-3}$

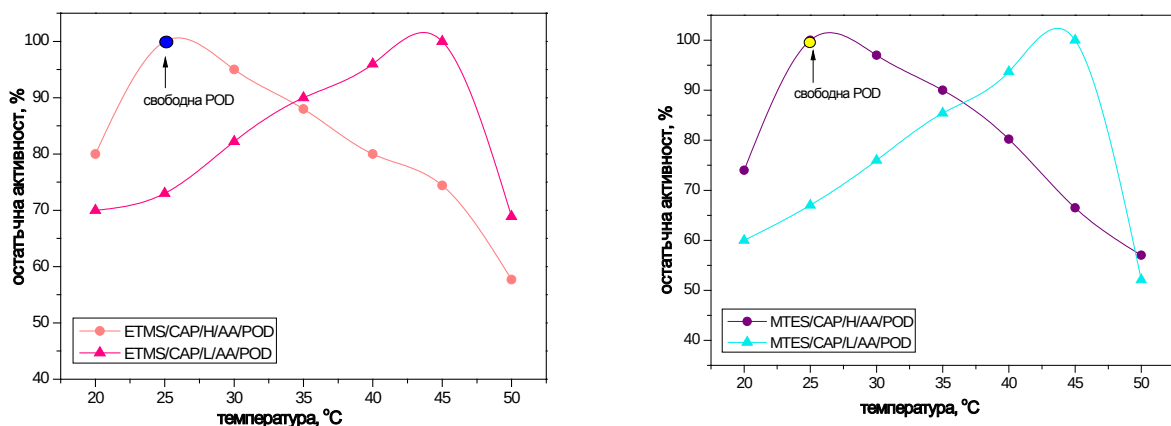
Обобщените данни от таблицата показват висока относителна активност за мембраните, съдържащи ETMS/CAP/H/AA/POD и MTES/CAP/H/AA/POD. Стойностите за K_m на свободна пероксидаза са $1,9 \cdot 10^{-3}$, а най-високо сродство към субстрата показва имобилизирания ензим върху матрица, съдържаща ETMS/CAP/H/AA – $5,0 \cdot 10^{-3}$. Получените стойности за K_m показват много добро сходство на имобилизираните ензими към субстрата, което прави матриците подходящи носители за имобилизация на POD. Поведението на имобилизирания ензим е изследвано по отношение влиянието на рН и температура. рН профилите на имобилизирана пероксидаза са определени в диапазон 4,5 – 7. Получените резултати са представени на фигура 14.



Фиг. 14. Влияние на рН върху активността на свободна и имобилизирана POD върху хибридна мембрана на основата на ETMS/CAP/H/AA и ETMS/CAP/L/AA (а) и MTES/CAP/H/AA и MTES/CAP/L/AA (б).

При всички изследвани матрици се наблюдава запазване на рН оптимума, идентичен на оптимума за свободна POD. Изключение е матрицата, съдържаща ETMS/CAP/L/AA/POD, като отместването е незначително до стойности на рН=6,5. Резултатите са показателни за неутралния характер на матриците, при които не се наблюдава отместване на рН профила, поради взаимодействия с функционалните групи на носителя. При всички носители се наблюдава висока остатъчна активност на имобилизирания ензим в широк диапазон на рН. Най-добри резултати показват матриците, съдържащи целулозен ацетат пропионат с висока молекулна маса, с 90% остатъчна активност при рН=5,5.

Интересен профил имат температурните криви на имобилизирания ензим. На фиг. 15 са представени профилите на температурните криви при различните носители, определени в диапазон $t = 20 - 50^\circ \text{C}$.



Фиг. 15. Температурен профил на имобилизирана POD върху хибридна мембрана на основата на ETMS/CAP/AA (ляво) и MTES/CAP/AA (дясно).

При сравнение между прекурсорите ETMS/CAP/H/AA и MTES/CAP/H/AA профилите на температурните криви са подобни. Това показва влияние на целулозното производно, а не на силициевия прекурсор върху общите свойства на носителите. При всички матрици се наблюдава широк профил на температурните криви с високи стойности на остатъчна активност. Въпреки по-ниската молекулна маса на целулозния ацетат пропионат матриците, които го съдържат показват по-висока температурна устойчивост, сравнено с тези, съдържащи целулозен ацетат пропионат с висока молекулна маса. Причина за това може да се потърси в разпределението на молекулите силициев диоксид в хибридната структура. Предвид устойчивостта на пероксидазата в широк температурен диапазон може да се направи заключение, че синтезираните матрици са подходящи носители, предпазващи имобилизираните ензимни молекули от влиянието на температурата. Това е особено важно, когато се работи с неустойчиви на температурни влияния ензими, имащи строго определен температурен оптимум.

2.3. Характеристика на имобилизираната тирозиназа спрямо субстрат L-тирозин

След установената биосъвместимост между трикомпонентните хибридни мембрани и моделния ензим – пероксидаза е проведена имобилизация на тирозиназа. Изследвани са каталитичните свойства на имобилизирания ензим спрямо два моделни субстрата: L- тирозин и L-DOPA.

В таблица 5 са обобщени каталитичните свойства на имобилизирана тирозиназа и сравнени с тези за свободен ензим при субстрат L-тирозин.

Таблица 5. Каталитични свойства на свободна и имобилизирана тирозиназа спрямо субстрат L-тирозин.

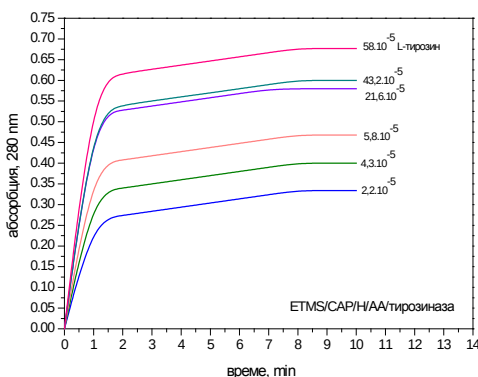
мембрана	количество свързан белтък [mg/g]	спец. акт. U/mg	относителна активност [%]	pH оптимум	темп. оптимум [°C]	K _m [M]
свободна тирозиназа	-	419	-	6,0	30	0,5x10 ⁻³
ETMS/CAP/H/AA	1,82	228	54,5	6,5	35	1,6x10 ⁻³
ETMS/ CAP/L/AA	1,91	170	40,6	7,5	35	1,5x10 ⁻³
MTES/CAP/H/AA	2,34	335	80,1	5,5	35	1,7x10 ⁻³
MTES/ CAP/L/AA	2,06	154	36,8	7,0	30	1,6x10 ⁻³

От всички носители най-висока специфична и остатъчна активност показва ензимът с имобилизирана тирозиназа върху матрица, съдържаща MTES/CAP/H/AA. Високата активност кореспондира с количеството свързан към матриците белтък.

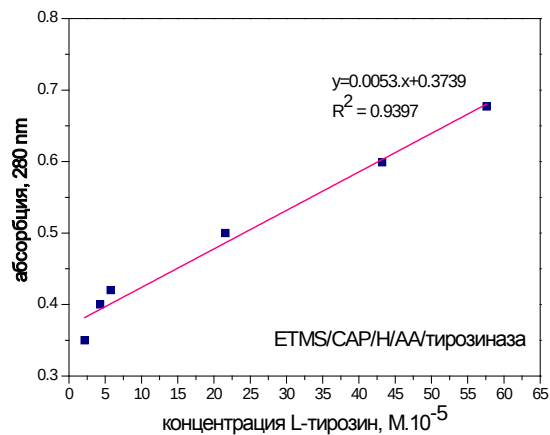
За проследяване кинетиката на свободна и имобилизирана тирозиназа е използван спектрофотометричен метод при $\lambda=280$ nm и различни субстратни концентрации на L-тирозин ($0,8 \cdot 10^{-3}$ - $8 \cdot 10^{-3}$ M). Конструиран е оптичен биосензор чрез фиксиране на хибридните мембрани към оптичните влакна и са проведени измервания в кинетичен режим. Получените зависимости са представени по-долу (табл. 6 и фигури 16-19).

Таблица 6. Параметри и характеристики на оптичните биосензори с имобилизирана тирозиназа.

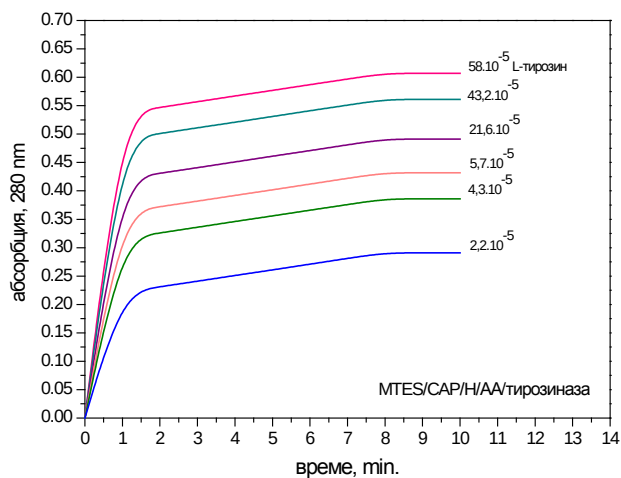
параметри	ETMS/CAP/H/AA	MTES/CAP/H/AA
линеен диапазон L-тирозин ($M \cdot 10^{-5}$)	2,2-58	2,2-58
функционална стабилност (дни)	30	20
R.S.D.% (n=10)	3,13	3,20
време за отговор (s)	60	60
R ²	0,9397	0,9025



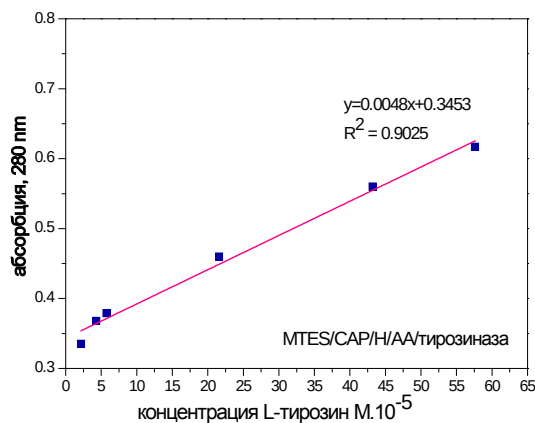
Фиг.16. Време за отговор на оптичен биосензор с имобилизирана тирозиназа върху матрица, съдържаща ETMS/CAP/H/AA при различни концентрации на L-тирозин.



Фиг.17. Стандартна крива за измерване на L-тирозин с оптичен биосензор с имобилизирана тирозиназа върху матрица, съдържаща ETMS/CAP/H/AA.



Фиг.18. Време за отговор на оптичен биосензор с имобилизирана тирозиназа върху матрица, съдържаща MTES/CAP/H/AA при различни концентрации на L-тирозин.

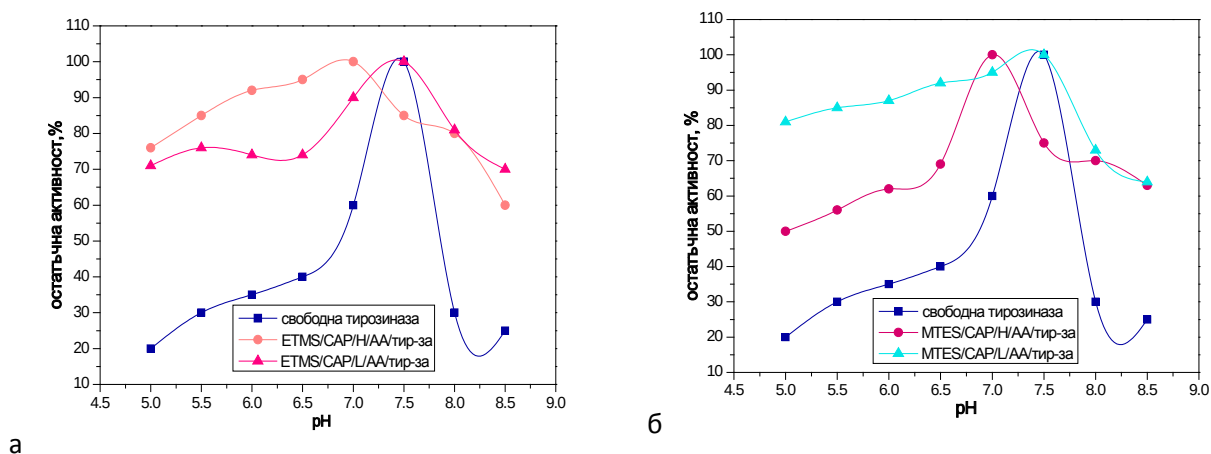


Фиг.19. Стандартна крива за измерване на L-тирозин с оптичен биосензор с имобилизирана тирозиназа върху матрица, съдържаща MTES/CAP/H/AA.

Както при POD, стойностите за K_m показват много добро сродство на свързания ензим към субстрата L-тирозин.

Мембраните показват много добра линейна зависимост в широк диапазон на субстратни концентрации. Предвид, че реакцията между тирозиназа и L-тирозин се отнася към бавните ензимни реакции, времето за отговор на конструирания биосензор е много добро – 60 секунди.

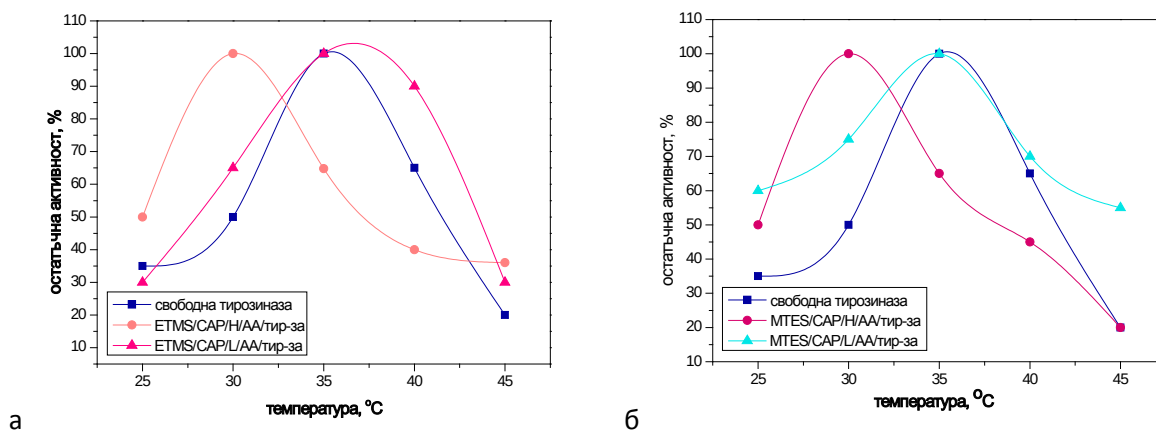
Определени са рН оптимумите на имобилизирания ензим в диапазон рН=5 – 8,5. На фигура 20 са представени профилите на получените зависимости.



Фиг.20. Влияние на рН върху активността на свободна и имобилизирана тирозиназа върху хибридна мембрана на основата на ETMS/H и ETMS/L/AA(а) и ETMS/H/AA и ETMS/L/AA(б).

При две от изследваните матрици ETMS/CAP/H/AA и MTES/CAP/H/AA се наблюдава незначително отместване на рН оптимума, сравнено спрямо свободния ензим. Прави впечатление широкия рН профил и високата остатъчна активност на имобилизирана тирозиназа върху матрици, съдържащи ETMS/CAP/H/AA и MTES/CAP/H/AA. Иmobилизираният ензим върху тези носители показва висока остатъчна активност – над 75 % за ETMS/CAP/H/AA и над 80% за MTES/CAP/H/AA в рН диапазон от 5 до 7,5.

При определяне температурния оптимум на имобилизирана тирозиназа, измерванията са извършени в диапазон 25-45° C. На фигура 21 са представени температурните профили на свободна и имобилизирана тирозиназа. При матриците, съдържащи ETMS/CAP/H/AA и MTES/CAP/H/AA се наблюдава отместване на температурния оптимум до $t = 30^{\circ}\text{C}$.



Фиг.21. Температурен профил на имобилизирана тирозиназа върху хибридна мембрана на основата на ETMS/CAP/H/AA, ETMS/CAP/L/AA (а) и MTES/CAP/H/AA, MTES/CAP/L/AA.

Наблюдава се висока остатъчна активност на имобилизираната тирозиназа. При сравнение профилите на температурните криви, поведението на матриците, съдържащи ETMS/CAP/H/AA и MTES/CAP/H/AA е идентично с имобилизираната POD. Наблюдава се отместване на оптимума към по-ниски температурни стойности. Тирозиназата, имобилизирана върху мембрани, съдържащи ETMS/CAP/H/AA и MTES/CAP/H/AA има по-добри каталитични свойства при по-ниски температури, но в широк диапазон на рН. Това позволява да бъдат подбрани конкретни матрици с имобилизиран ензим, съобразени с изискванията на експеримента.

2.4. Характеристика на имобилизираната тирозиназа спрямо субстрат L-DOPA

Имобилизираната върху хибридни матрици тирозиназа е изследвана с втори моделен субстрат – L-DOPA. Тирозиназата проявява по-високо сродство към L-DOPA, в сравнение с L-тирозин като субстрат. В таблица 7 са обобщени данните за каталитичните свойства на имобилизирана тирозиназа спрямо субстрат L-DOPA.

Таблица 7. Каталитични свойства на свободна и имобилизирана тирозиназа спрямо субстрат L-DOPA и допамин.

мембрана	кол-во свързан белтък [mg/g]	спец. акт. U/mg	отн. активност [%]	pH опт.	темп. опт. [°C]	Km (M)	Vmax (mmol/min.mg)	R ²
свободна тирозиназа	-	421	-	6,0	30	1,51x10 ⁻³	7,54	0,9812
- L- DOPA						1,83x10 ⁻³	8,26	0,9903
- допамин								
ETMS/CAP/H/AA	1,82	322	76,48	6,5	35	12,66x10 ⁻³	26,39	0,9195
ETMS/CAP/L/AA	1,91	317	75,29	5,5	35	13,88x10 ⁻³	31,55	0,9804
MTES/CAP/H/AA								
- L- DOPA	2,34	312	74,10	7,5	35	8,42x10 ⁻³	36,63	0,9101
- допамин						9,06x10 ⁻³	37,82	0,9363
MTES/CAP/L/AA	2,06	306	72,68	7,0	30	14,25x10 ⁻³	26,88	0,9667

За проследяване кинетиката на свободна и имобилизирана тирозиназа е използван спектрофотометричен метод при $\lambda=475$ nm при различни субстратни концентрации на L-DOPA и допамин ($0,8 \cdot 10^{-5}$ - $8 \cdot 10^{-5}$ M).

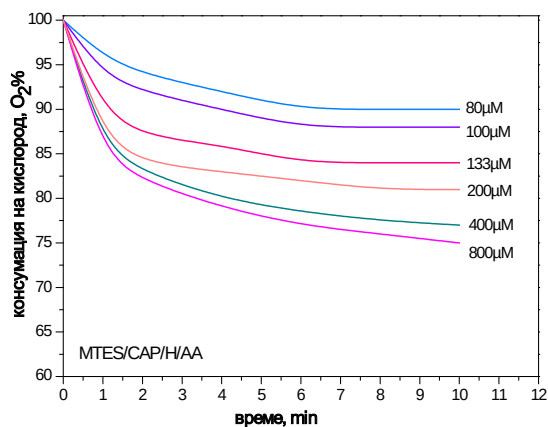
Резултатите за Km и Vmax показват сродството на ензима към субстрата. Най-близки стойности за Km до тези за свободния ензим има имобилизирания ензим върху матрица на основата на MTES/CAP/H/AA с Km = $8,42 \cdot 10^{-3}$ M. Стойностите за Km са близки за всички матрици. По-ниски стойности на Km имат матриците, съдържащи целулозен ацетат бутират с висока молекулна маса.

Конструиран е оптичен биосензор чрез фиксиране на хибридните мембрани с имобилизирана тирозиназа към оптичните влакна и са проведени измервания в кинетичен режим. Получените зависимости са представени по-долу (таблицы 8-12 и фигури 22-31).

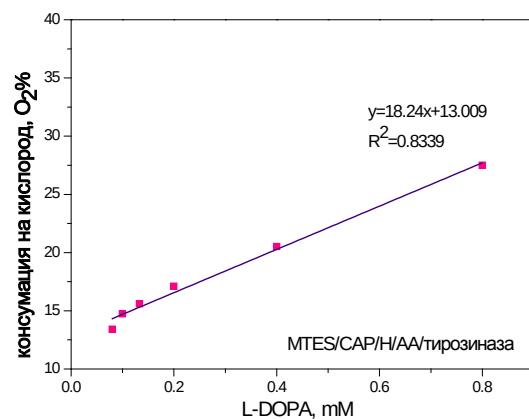
Оптични биосензори с имобилизирана върху хибридни мембрани тирозиназа

Таблица 8. Статистически данни от определената консумация на кислород с биосензор на основата на хибридна мембрана, съдържаща MTES/CAP/H/AA/тирозианаза.

MTES/CAP/H/AA/тирозианаза						
концентрация L-DOPA	n	средна стойност ($\bar{X}$)	стандартно отклонение (S)	вариационен коефициент	относително стандартно отклонение (R.S.D. %)	грешка
80μM	10	88,55	0,01964	0,0221	2,21	0,000386
800μM	10	75,21	0,02133	0,0283	2,83	0,000455
80μM допамин	10	87,83	0,02376	0,0211	2,02	0,000239
800μM допамин	10	76,34	0,02894	0,0340	2,34	0,000376



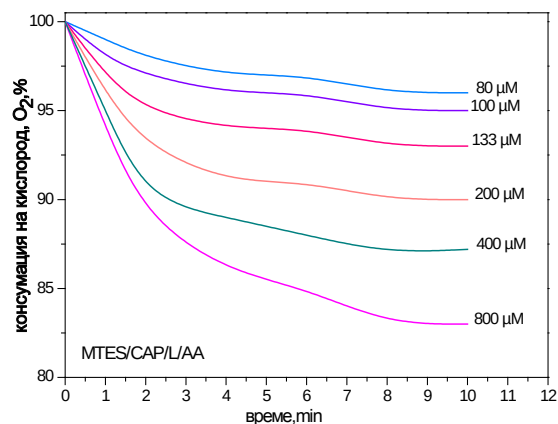
Фиг.22. Време за отговор на оптичен биосензор на основата на MTES/CAP/H/AA за консумацията на кислород при различни концентрации на L-DOPA.



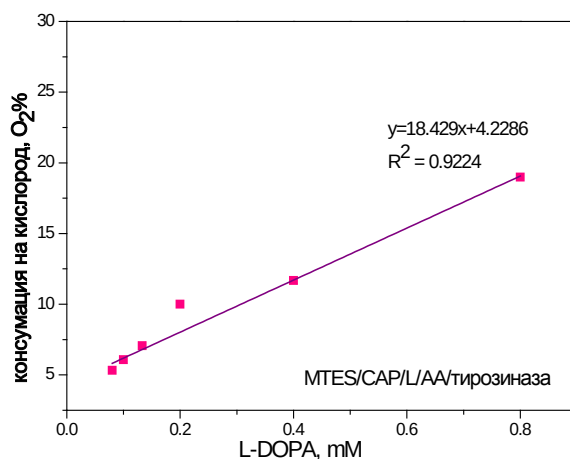
Фиг.23. Стандартна крива за L-DOPA, получена от биосензор с оптично влакно на основата на MTES/CAP/H/AA и изчислена консумация на кислород.

Таблица 9. Статистически данни от определената консумация на кислород с биосензор на основата на хибридна мембрана, съдържаща MTES/CAP/L/AA/тирозилаза.

MTES/CAP/L/AA/тирозилаза						
концентрация L-DOPA	n	средна стойност ($\bar{X}$)	стандартно отклонение (S)	вариационен коефициент	относително стандартно отклонение (R.S.D. %)	грешка
80 μM	10	96,53	0,01938	0,02008	2,01	0,000376
800 μM	10	84,17	0,02192	0,02604	2,60	0,021925



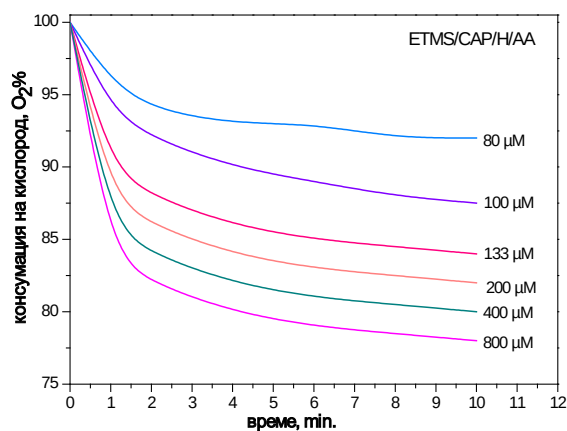
Фиг. 24. Време за отговор на оптичен биосензор на основата на MTES/CAP/L/AA за консумацията на кислород при различни концентрации на L-DOPA.



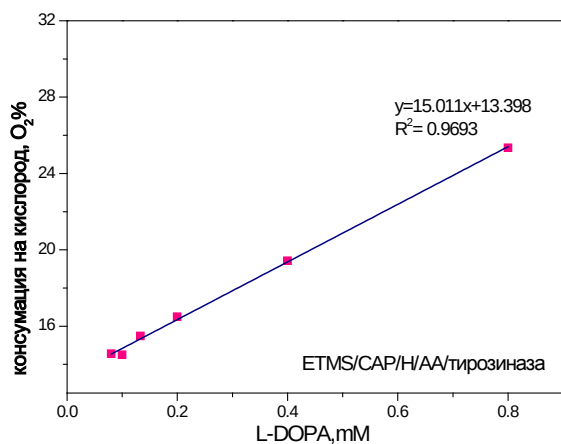
Фиг.25. Стандартна крива за L-DOPA, получена от биосензор с оптично влакно на основата на MTES/CAP/L/AA и изчислена консумация на кислород.

Таблица 10. Статистически данни от определената консумация на кислород с биосензор на основата на хибридна мембрана, съдържаща ETMS/CAP/H/AA/тирозилаза.

ETMS/CAP/H/AA/тирозилаза						
концентрация L-DOPA	n	средна стойност ($\bar{X}$)	стандартно отклонение (S)	вариационен коефициент	относително стандартно отклонение (R.S.D. %)	грешка
80μM	10	93,25	0,02147	0,02257	2,26	0,000443
800μM	10	78,48	0,02196	0,02798	2,79	0,000482



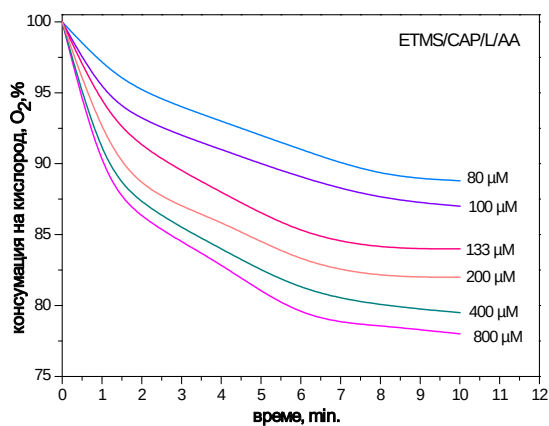
Фиг.26. Време за отговор на оптичен биосензор на основата на ETMS/CAP/H/AA за консумацията на кислород при различни концентрации на L-DOPA.



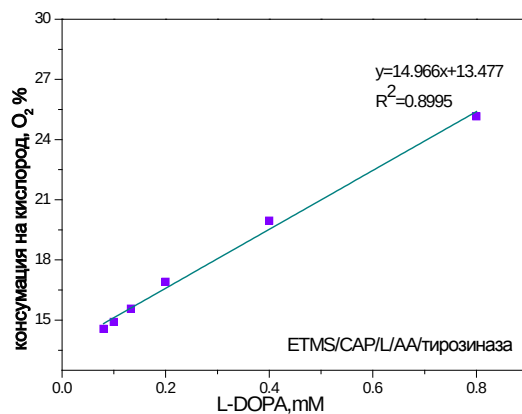
Фиг.27. Стандартна крива за L-DOPA, получена от биосензор с оптично влакно на основата на ETMS/CAP/H/AA и изчислена консумация на кислород.

Таблица 11. Статистически данни от определената консумация на кислород с биосензор на основата на хибридна мембрана, съдържаща ETMS/CAP/L/AA/тирозиназа.

ETMS/CAP/L/AA/тирозиназа						
концентрация L-DOPA	n	средна стойност ($\bar{X}$)	стандартно отклонение (S)	вариационен коефициент	относително стандартно отклонение (R.S.D. %)	грешка
80μM	10	89,52	0,01839	0,020553	2,05	0,000339
800μM	10	78,74	0,02054	0,026094	2,61	0,000422



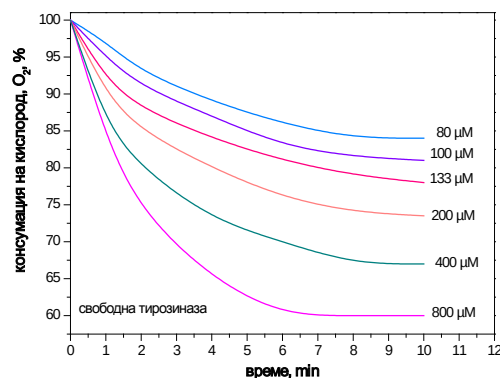
Фиг.28. Време за отговор на оптичен биосензор на основата на ETMS/CAP/L/AA за консумацията на кислород при различни концентрации на L-DOPA.



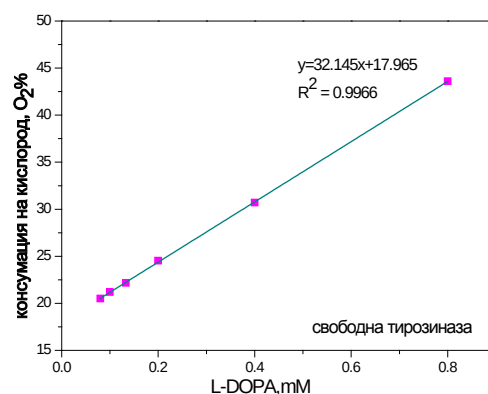
Фиг.29. Стандартна крива за L-DOPA, получена от биосензор с оптично влакно на основата на ETMS/CAP/L/AA и изчислена консумация на кислород.

Таблица 12. Статистически данни от определената консумация на кислород за свободна тирозиназа.

Свободна тирозиназа						
концентрация L-DOPA	n	средна стойност ($\bar{X}$)	стандартно отклонение (S)	вариационен коефициент	относително стандартно отклонение (R.S.D. %)	грешка
80μM	10	83,92	0,002939	0,00350	0,35	0,00008
800μM	10	59,86	0,002276	0,00380	0,38	0,00005
80μM допамин	10	84,63	0,002476	0,0036	0,36	0,00009
800μM допамин	10	60,37	0,002694	0,0039	0,39	0,00007



Фиг.30. Консумацията на кислород при различни концентрации на L-DOPA за свободна тирозиназа.



Фиг.31. Стандартна крива за L-DOPA спрямо консумация на кислород на свободна тирозиназа.

Със сензора е определена консумацията на кислород спрямо субстрат L-DOPA в диапазон (80-800 μM). Конструираният биосензор показва отлична оперативна стабилност, кратко време за отговор (по-малко от 30 секунди) и добра линейна зависимост. Биосензорът е много чувствителен дори към малки промени на субстратната концентрация, между 80-100 μM , като откриваемият минимум (LOD) за имобилизираните ензими е установен при 20 μM . Най-добри работни параметри показват матриците, съдържащи ETMS/CAP/H/AA и MTES/CAP/H/AA.

2.5. Двуетимни системи. Измервания консумацията на кислород в изследваните проби

Мултиензимните системи се формират от група ензими, участващи в обща реакция с активен и за двата ензима субстрат. При конструиране на мултиензимни системи, единият ензим е водещ, а останалите ензими присъстват в количества, които осигуряват по-висока каталитична активност в сравнение с тази на ензимите, взети по отделно. Обикновено вторият ензим се явява подчинен на водещия и катализира реакцията само при постъпването на достатъчни количества субстрат в системата. При имобилизация на

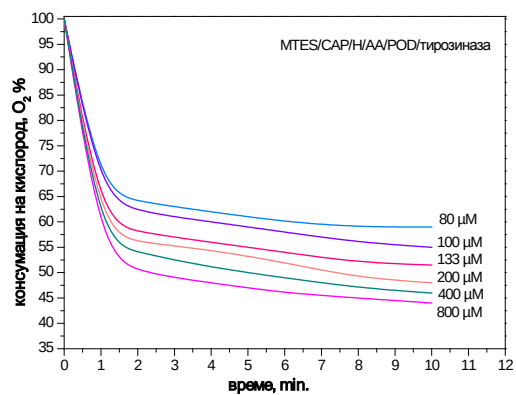
двуензимни и мултиензимни системи, основно изискване към носителя е той да бъде биосъвместим за всички ензими, включени в системата.

Мембраните са приложени за носители на двуензимната система – тирозиназа/пероксидаза. Върху имобилизираните с тирозиназа матрици е извършена имобилизация на пероксидаза – предварително окислена и диализирана. При имобилизация на тирозиназа и пероксидаза, ензимните молекули повишават каталитичната активност на реакцията. Това се дължи на по-ефективното запълване на повърхността на матриците, като разликата в молекулните маси на ензимите (тирозидаза ~ 120 kDa, пероксидаза ~ 44 kDa) се явява допълнителен благоприятен фактор. По този начин се осъществява ефективно запълване на повърхността на матриците на места, където тирозиназните молекули могат да си оказват взаимно запрещаващ ефект. Така формираната ензимна повърхност повишава взаимодействието ензим/субстрат, а от там и скоростта на катализираната реакция. На фигурите по-долу (фигури 32-35) са представени графиките на определената със сензора консумация на кислород спрямо субстрат L-DOPA. В таблици 13 и 14 са обобщени статистическите данни за конструираните с двуензимна система биосензори.

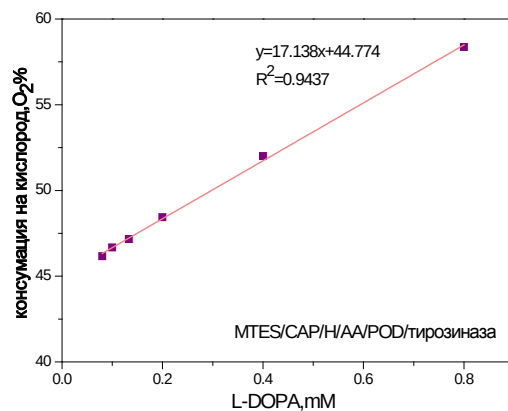
Оптичен биосензор с имобилизирана върху хибридни мембрани двуензимна система тирозиназа/POD

Таблица 13. Статистически данни от определената консумация на кислород за двуензимна система върху матрица, съдържаща MTES/CAP/H/AA/POD/тирозидаза.

MTES/CAP/H/AA/POD/тирозидаза						
концентрация L-DOPA	n	средна стойност ($\bar{X}$)	стандартно отклонение (S)	вариационен коефициент	относително стандартно отклонение (R.S.D. %)	грешка
80 μ M	10	59,24	0,00995	0,01681	1,68	0,00009
800 μ M	10	44,21	0,008727	0,01974	1,96	0,00007



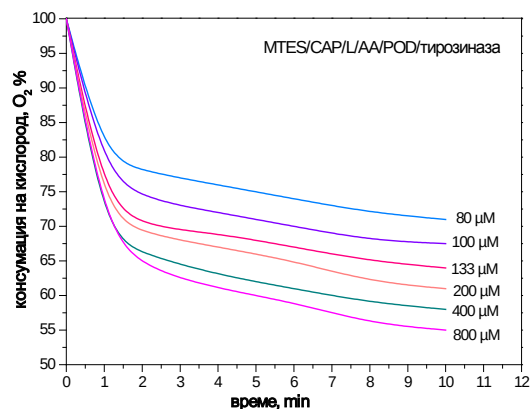
Фиг.32. Време за отговор на оптичен биосензор с двуензимна система на основата на MTES/CAP/H/AA/POD/тирозилаза за консумацията на кислород при различни концентрации на L-DOPA.



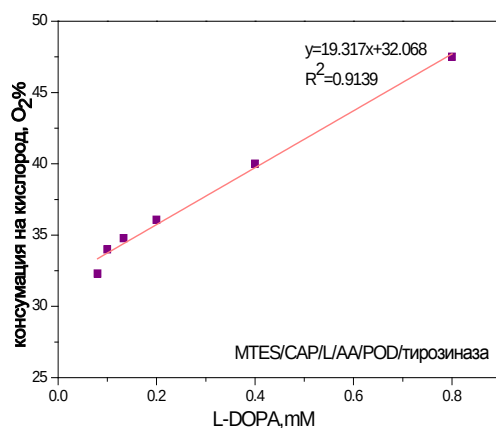
Фиг.33. Стандартна крива за L-DOPA, получена от биосензор с оптично влакно на основата на двуензимна система MTES/CAP/L//AAPOD/тирозилаза и изчислена консумация на кислород.

Таблица 14. Статистически данни от определената консумация на кислород за двуензимна система върху матрица, съдържаща MTES/CAP/L/AA/POD/тирозилаза.

MTES/CAP/L/AA/POD/тирозилаза						
концентрация L-DOPA	n	средна стойност ($\bar{X}$)	стандартно отклонение (S)	вариационен коефициент	относително стандартно отклонение R.S.D. %	грешка
80μM	10	71,06	0,01230	0,017311	1,73	0,000151
800μM	10	55,15	0,00999	0,01812	1,81	0,00009



Фиг.34. Време за отговор на оптичен биосензор с двуензимна система на основата на MTES/CAP/L/AA/POD/тирозилаза за консумацията на кислород при различни концентрации на L-DOPA.



Фиг.35. Стандартна крива за L-DOPA, получена от биосензор с оптично влакно на основата на двуензимна система MTES/CAP/L/AA/POD/тирозилаза и изчислена консумация на кислород.

За определяне ефективността на двуензимната система и сравнение с предходния експеримент, за субстрат е използвана L-DOPA с концентрация (80-800 μM).

Резултатите от измерванията с биосензора показват значително повишение на каталитичната активност при двуензимната система, изразена в повишена консумация на кислород при идентично време за реакция. При свободна тирозилаза се наблюдава промяна в консумацията на кислород от 74% до 50%. Иммобилизираната тирозилаза има стабилно поведение при измерванията и се наблюдава отлична линейна зависимост при промяна в концентрациите на субстрата. Мембраните, съдържащи ETMS/CAP/H/AA/тирозилаза променят над 33% активността си в двуензимна система с пероксидаза. Така при тези матрици консумацията на кислород от 83% за 400 μM субстрат се променя до 50% при еднакви субстратни концентрации. Най-ефективно работеща двуензимна система е тази, иммобилизирана върху мембрана, съдържаща MTES/CAP/H/AA, където показателите за консумация на кислород се променят от 80% на 50%. Водеща с

най-добри показатели при двуензимната система е матрицата, съдържаща MTES/CAP/L/AA, където наблюдаваната промяна е от 90% консумация на кислород до 45%. Това може да бъде обяснено със свободните функционални групи в структурата на носителя, които вторият ензим успешно попълва, повишавайки каталитичната активност на сензора. В таблица 15 са обобщени резултатите от измерванията за мембраните, показващи най-добри работни параметри.

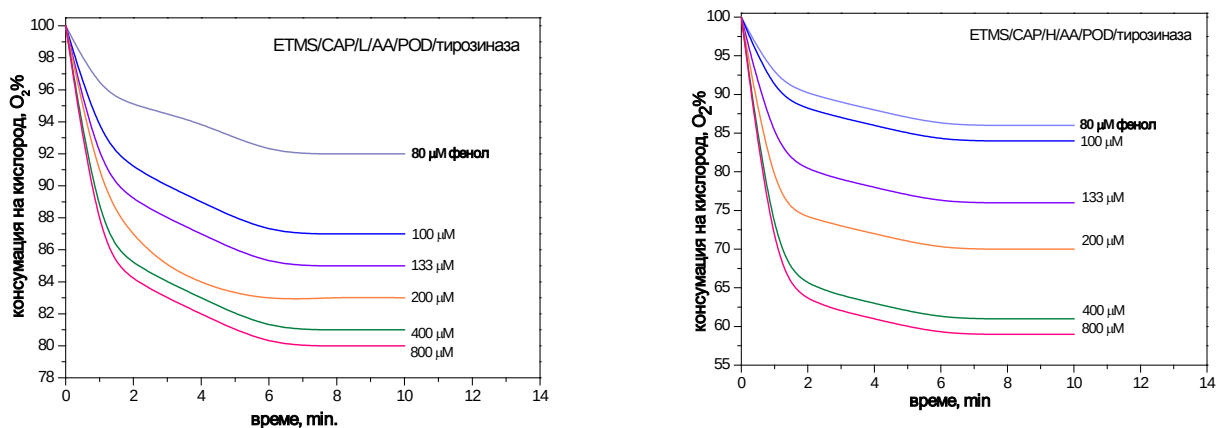
Таблица 15. Характеристики на биосензор с оптични влакна за измерване консумацията на кислород спрямо субстрат L-DOPA.

вид мембрана	ензим	време живот на сензора (дни)	линеен диапазон	откриваем минимум (LOD), μM	време за отговор (s)	R^2
хибридна мембрана ETMS/CAP/H/AA	тирозиназа	30	80-800 μM	20	30	0,9693
хибридна мембрана MTES/CAP/H/AA	тирозиназа	30	80-800 μM	20	30	0,8339
хибридна мембрана MTES/CAP/H/AA	тирозиназа/POD	30	80-800 μM	10	15	0,9437
хибридна мембрана MTES/CAP/L/AA	тирозиназа/POD	30	80-800 μM	10	15	0,9139
-	свободна тирозиназа	-	80-800 μM	1-3	10	0,9966

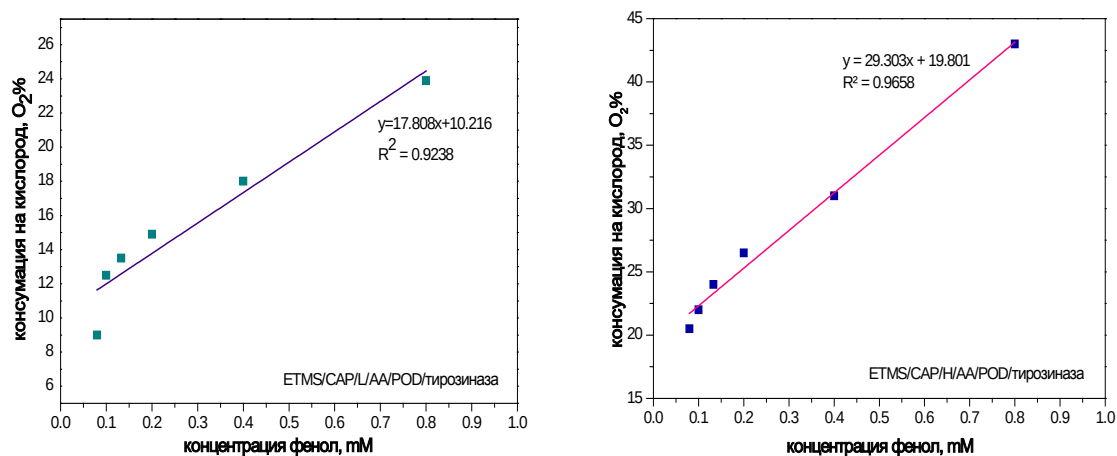
2.6. Конструирание на оптичен биосензор на основата на двуензимна система за определяне на фенол.

За определяне ефективността на двуензимната система и сравнение с предходния експеримент, за субстрат е използван фенол с концентрация 80-800 μM . Същата концентрация е използвана при субстрат L-DOPA. Получените резултати са представени по-долу (фигури 36 и 37 и таблица 16).

Оптический биосенсор за определяне на фенол с имобилизирана върху хибридни мембрани двуензимна система тирозиназа/POD



Фиг.36. Време за отговор на оптичен биосензор с двуензимна система на основата на ETMS/CAP/L/POD/тирозилаза (от ляво) и ETMS/CAP/H/POD/тирозилаза (от дясно) за консумацията на кислород при различни концентрации на фенол.



Фиг.37. Стандартна крива за фенол, получена от биосензор с оптично влакно на основата на двуензимна система ETMS/CAP/L/AA/POD/тирозилаза (от ляво) и ETMS/CAP/H/AA/POD/тирозилаза (от дясно) за консумация на кислород.

Таблица 16. Статистически данни от определената консумация на кислород за двуензимна система върху матрица, съдържаща ETMS/CAP/L/AA/POD/тирозиназа и ETMS/CAP/H/AA/POD/тирозиназа.

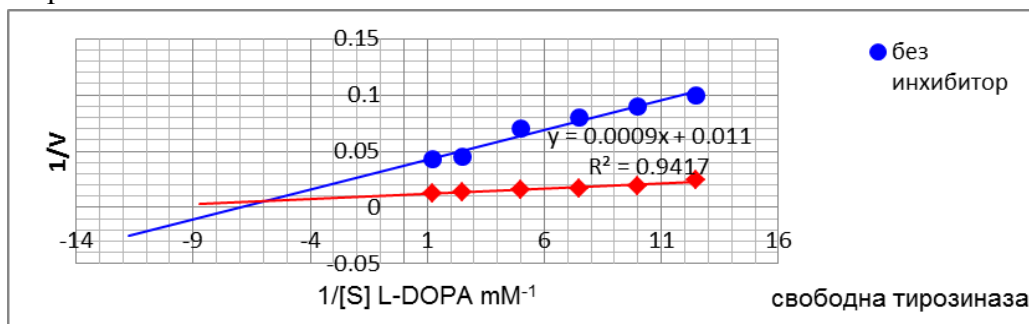
ETMS/CAP/L/AA/POD/тирозиназа ($R^2 = 0,9238$)						
концентрация фенол	n	средна стойност ($\bar{X}$)	стандартно отклонение (S)	вариационен коефициент	относително стандартно отклонение R.S.D. %	грешка
80 μ M	10	91,92	0,02112	0,02297	2,29	0,000446
800 μ M	10	79,90	0,01811	0,02267	2,27	0,000328
ETMS/CAP/H/AA/POD/тирозиназа ($R^2 = 0,9658$)						
80 μ M	10	86	0,01679	0,01953	1,95	0,000282
800 μ M	10	59	0,01187	0,02011	2,01	0,000141

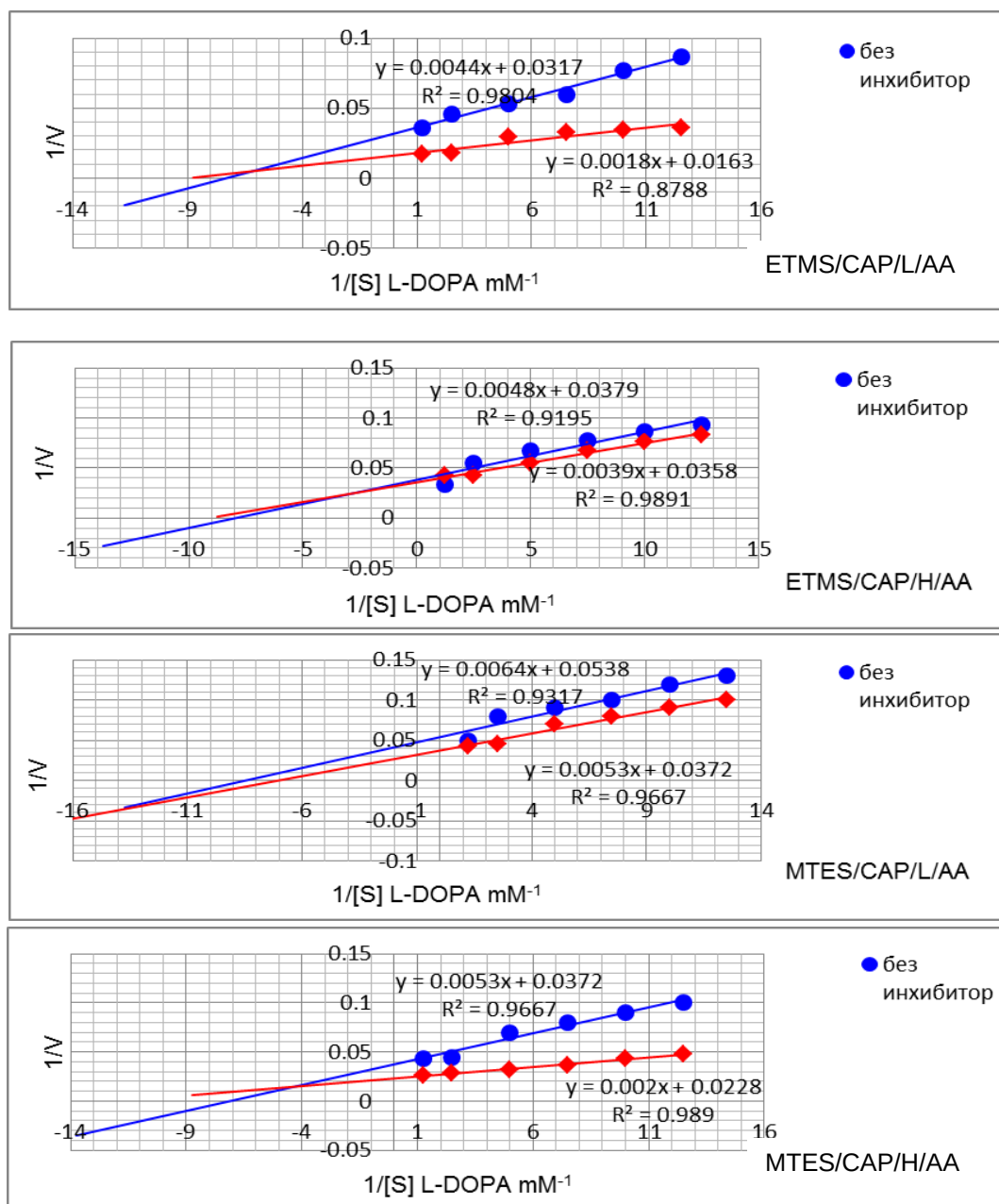
Резултатите от измерванията показват много добра линейна зависимост между концентрацията на фенол и консумацията на кислород. Мембраната, съдържаща ETMS/CAP/H/AA показва по-добър коефициент на корелация $R^2 = 0,9658$. Също така, при идентични концентрации на фенол с тези на L-DOPA, получените зависимости са близки, което е показателно за високото сродство на ензима към субстрата.

3. Конструирание на оптичен биосензор на принципа на инхибиторни реакции. Инхибиране с бензоена киселина. Изследване потенциалното инхибиторно действие на белтъчни производни на галантамина – I₁, I₂, I₃.

3.1. Конструирание на оптичен биосензор за определяне на бензоена киселина

Проведени са изследвания за инхибиторното действие на класически за тирозиназите инхибитор – бензоена киселина. Инхибиторното действие е определено спрямо субстрат L-DOPA при различни концентрации ($0,8 \cdot 10^{-5}$ – $8 \cdot 10^{-5}$ M) и концентрация на бензоената киселина $1,64 \cdot 10^{-2}$ M. Резултатите от измерванията показват неконкурентно инхибиране спрямо тирозиназата. На фигура 38 са представени резултатите за свободен и имобилизиран ензим.





Фиг.38. Зависимост на V от S в координати на Лайуивиър-Бърк спрямо субстрат L-DOPA за имобилизирана и свободна тирозиназа в присъствие на инхибитор – бензоена киселина.

При неконкуретното инхибиране, инхибиторът не повлиява свързването на ензима със субстрата. Инхибиторът се свързва с ензима, независимо от субстрата, като се наблюдава понижение в стойностите на $V_{\text{max,app}}$, но не се променят стойностите на K_m . Това означава, че $V_{\text{max,app}} < V_{\text{max}}$, а $K_{m,app} = K_m$.

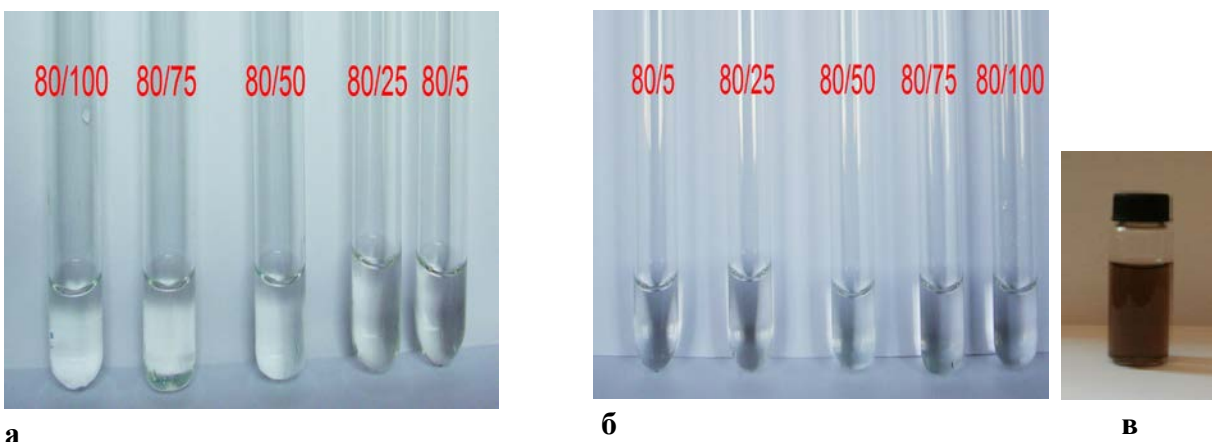
Обяснение за това е фактът, че при този тип инхибиране, инхибиторът се свързва еднакво добре както със свободния ензим, така и с ензимно-субстратния комплекс, без да променя афинитета на ензима към субстрата.

3.2. Инхибитори на основата на модифициран с пептидна верига галантамин.

При изследване на новосинтезирани инхибитори, на основата на модифициран с пептидна верига галантамин (I_1 , I_2 и I_3), се установи, че те действат върху тирозиназата като инхибитори от смесен тип.

При безконкурентното инхибиране инхибиторът се свързва само с ензимно-субстратния комплекс, но не и със свободния ензим. При този тип инхибиране се наблюдава понижение както при $V_{\max,app}$, така и при $K_{m,app}$, като $V_{\max,app} < V_{\max}$ и $K_{m,app} < K_m$. При ниски субстратни концентрации, безконкурентните инхибитори имат малък ефект върху скоростта на реакцията.

След спектрофотометричното определяне на инхибиторното действие на модифициран с пептидни вериги галантамин, пробите, съдържащи субстрат L-DOPA, ензим и инхибитор са съхранявани на тъмно при $t=4^\circ\text{C}$ в продължение на 30 дни. Периодично на 1-вия, 15-ия и на 30-я ден е снеман спектърът на пробите, за да се определи влиянието на инхибиторите във времето спрямо скоростта на образуване на крайния продукт – меланин. На фигура 39 са представени изображения от изследването на промяната в интензитета на оцветяването на пробите спрямо времето. Пробите представени на фигурата по-долу съдържат L-DOPA ($80\mu\text{M}$), тирозиназа $1\mu\text{L/в } 3\text{ml}$ реакционна смес и различни концентрации на инхибитор.



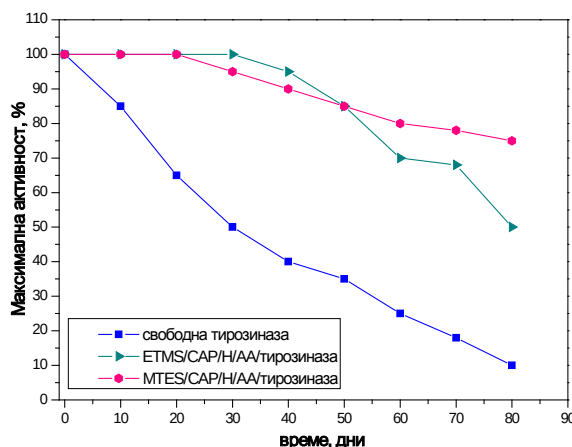
Фиг. 39. Влияние на инхибитор (I_2) спрямо свободна тирозиназа върху скоростта на образуване на меланин (в) на 15 ден (а) и на 30-я ден (б) от инкубиране на пробите.

Данните за всички инхибитори са идентични на тези за I_2 . Резултатите от изследванията показват, че и трите инхибитора на основата на модифициран с пептидна верига галантамин имат отлични инхибиторни свойства спрямо свободна и имобилизирана тирозиназа, като потискат образуването на меланин за период, по - дълъг от 15 дни.

3.3. Време на живот на конструираните оптични биосензори

Един от най-важните параметри при конструирането на биосензорите е тяхната оперативна стабилност при съхранение. Предвид, че свободната тирозиназа губи активност много бързо (под формата на лиофилизат, при съхранение при -20°C , ензимът

губи активност за една година), освен работните параметри на конструираните биосензори, важен фактор е запазването на оперативната им стабилност за по-дълъг период от време. Матриците с имобилизирана тирозиназа са съхранявани във фосфатен буфер с $pH=6,5$, при $t = 4^{\circ}C$. На всеки десет дни е определяна относителната активност на имобилизирания ензим. На фигура 40 е представена определената максимална активност на имобилизирания ензим върху матриците, показващи най-добри каталитични параметри – ETMS/CAP/H/AA и MTES/CAP/H/AA.



Фиг.40. Максимална активност на имобилизираната тирозиназа за период от 80 дни.

Имобилизираният ензим върху матрица, съдържаща ETMS/CAP/H/AA запазва максималната си активност за 30 дни, а матрицата съдържаща MTES/CAP/H/AA – за 20 дни.

И двете хибридни мембрани запазват висока активност – 80-90 % за период от 50 дни, което съпоставено с данните за свободна тирозиназа прави тези носители подходящи за биосензори.

4. SPR определяне оптималните параметри на тънки полимерни слоеве от съполимер на акриламид/акрилонитрил, получени по spin-coating метод. QCM *in situ* изследване имобилизацията на тирозиназа.

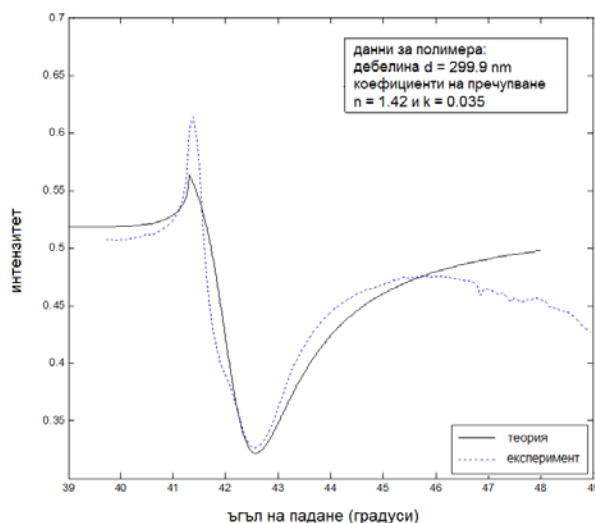
4.1. Получаване и охарактеризиране на тънки полимерни слоеве

За получаване на тънки полимерни слоеве е използван spin –coating метод. За определяне параметрите на полимерните слоеве – дебелина и коефициенти на пречупване е използван повърхностен плазмонен резонанс - SPR. Върху повърхността на покривно стъкло е нанесен тънък златен слой (от порядъка на 45 nm). Образецът е прикрепен върху хипотенузата на стъклена призма и поставен на оптичната ос на гониометър. Системата призма-образец е осветена с лазер, с дължина на вълната 635 nm. Отразената светлина преминава през система от лещи и попада върху детектор. Измерена е зависимостта на интензитета на отразената от образца светлина от ъгъла на падане на осветяващия лъч. При определени ъгли на падане енергията на фотоните от светлината преминава в енергия

на трептене на електроните в златния слой, при което се възбуждат повърхнинни вълни - плазмони на външната повърхност на златния слой. Това се отразява като минимум в кривата на интензитета на отразената светлина (резонансна крива). Този минимум е много чувствителен към промени, протичащи на повърхността на златния слой. Чрез отчитане на позицията, дълбочината и ширината му са определени параметрите на полимерните слоеве, нанесени върху златния филм.

Съполимер от акриламид/акрилонитрил е разтворен в DMF и нанесен върху образци за SPR измервания. Подготвени са четири серии образци по spin coating метод при различни обороти – 2000, 2500 и 3000 rpm и време $t = 60$ секунди.

При първата серия образци е използван 100 mg AA и 6 ml DMF при 2000 rpm. Със SPR метода е измерена зависимостта на интензитета на отразената светлина от системата покривно стъкло/златен слой/полимерен слой от ъгъла на осветяване. От експериментално определените резонансни криви, с помощта на програмите за минимизация от пакета на MatLab са определени параметрите на нанесените полимерните слоеве – дебелина и коефициент на пречупване. Резултат от първите измервания е представен на фигура 41.

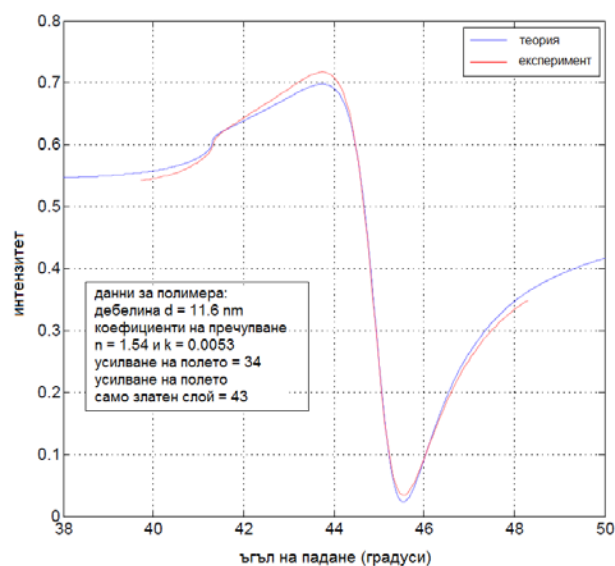


Фиг.41. Съпоставка на експерименталните и теоритично определените параметри на полимерния слой при първата серия отливане на образци.

От фигурата се вижда, че при това съотношение полимер/разтворител се получава дебел слой, което не отговаря изискванията на експеримента.

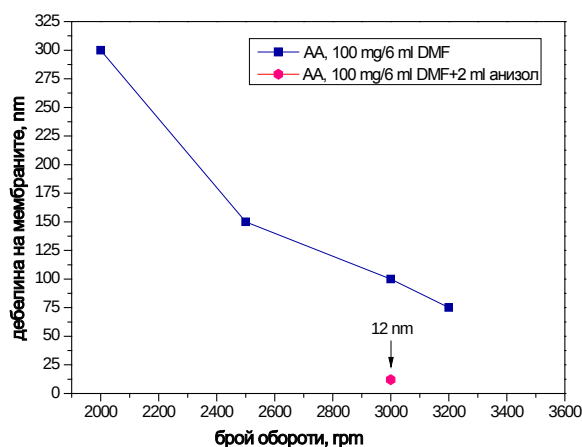
С увеличение на оборотите, дебелината на мембраните намалява, но все още не достатъчна съгласно изискванията на експеримента.

С цел намаляване дебелината на полимерния слой е направено разреждане с анизол (2ml) и увеличаване на оборотите за отливане на 3000 rpm/min. Включването на анизол в системата полимер/DMF променя не само вискозитета на разтвора, но и подобрява омокряемостта на златния слой на образца. Температурата и времето за фиксиране на слоя във вакуум сушилнята остават непроменени. Следвайки гореописаната процедура са получени нови серии от данни, представени на фигура 42.



Фиг.42. Съпоставка на експерименталните и теоритично определените параметри на полимерния слой при втората серия отливане на образци.

На фигура 43 е представена установената зависимост между броя обороти за минута в spin coating режим и дебелината на мембраните, получени от съполимер на акриламид/акрилонитрил при описаните съотношения полимер/разтворител.



Фиг.43. Зависимост между дебелините на мембраните, получени от AA и броя на оборотите.

След отливане на тънките полимерни слоеве и достигане на оптимална дебелина на покритието (12 nm), върху образците е извършена имобилизация на тирозиназа за 16 часа при $t=4^{\circ}\text{C}$. Количеството свързан белтък към повърхността на златните образци с нанесен полимерен слой е определено с модифициран метод на Лоури. Спектрофотометрично е определена специфичната активност на свързаната тирозиназа спрямо субстрат L-DOPA (800 μM) Данните са обобщени и представени в таблица 17.

Таблица 17. Специфична активност на тирозиназа и количество свързан белтък към златни образци за SPR с нанесени полимерни слоеве.

N:	Полимер	отлят при (rpm)	количество свързан белтък (mg/ml)*	специфична активност (U/ml)*	относителна активност (%)
1	(AA/DMF) – 100 mg/6ml	2000	$3,6 \cdot 10^{-4}$	313	74,9
2	(AA/DMF) – 100 mg/6ml	3000	$3,8 \cdot 10^{-4}$	283	67,7
3	(AA/DMF/анизол)-100 mg/6ml/2 ml	3000	$4,0 \cdot 10^{-4}$	271	64,8
4	тирозиназа	-	$3,7 \cdot 10^{-4}$	418	-

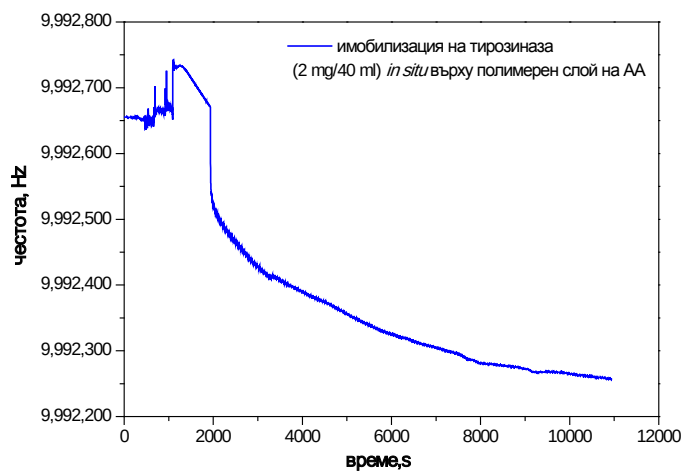
*Поради тънките полимерни покрития не е възможно да се определи количеството свързан белтък спрямо (mg/g абсолютно сух носител). Получените стойности за количество свързан ензим са преизчислени спрямо реакционния обем (mg/ml).

Резултатите от изследването показват близки стойности на относителна активност при различни дебелини на полимерния слой. При тези размери на тънките покрития се допуска, че ензимът не прониква във вътрешността на полимерния слой.

Експериментите са повторени няколко пъти за потвърждение на представените в таблицата резултати. Ако се допусне статистическа грешка при измерванията, то може да се направи извод, че при полимерни покрития от акриламид/акрилонитрил до 300 nm, дебелината на полимера практически не оказва влияние на количеството свързан ензим.

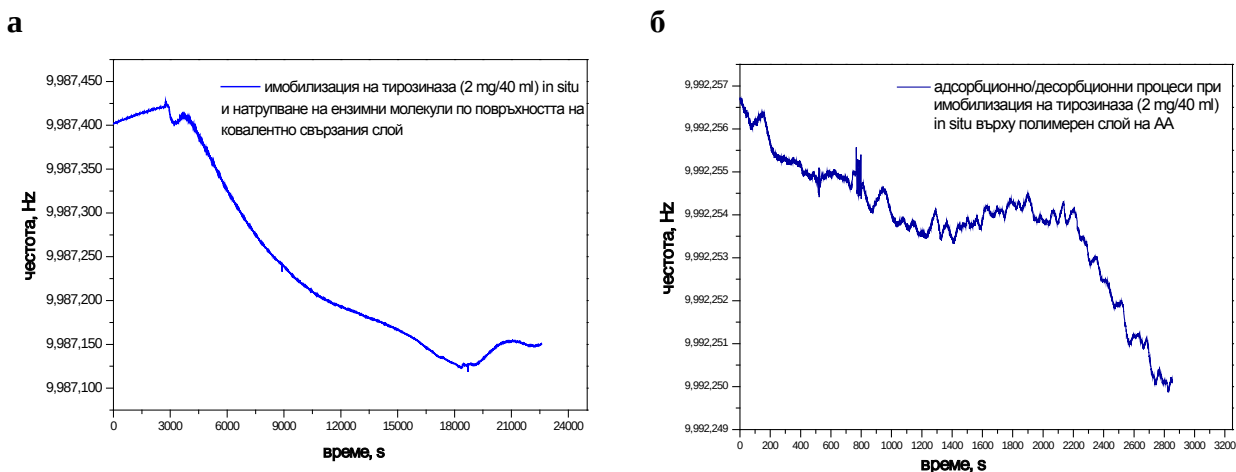
4.2. QCM *in situ* изследване имобилизацията на тирозиназа

Определеното съотношение полимер/разтворител е приложено за получаване на тънки покрития върху кварцов резонатор за QCM. Проследена е имобилизация *in situ* на тирозиназа. За стабилизиране на честотите първоначално през системата се пропуска дестилирана вода. На фигура 44 е представен QCM профил на имобилизация на тирозиназа върху полимерен слой. За време 3,2 часа, при 1,2 rpm скорост на помпата, подаваща ензимния разтвор, се наблюдава понижение от 400 Hz. Процесът на преминаване и свързване към повърхността на резонатора на ензимните молекули е равномерен и линеен. След определеното време от 3,2 часа настъпва запълване на повърхността на резонатора. Наблюдават се колебания в показанията на честотите. Вероятна причина за това са протичащите адсорбционни/десорбционни процеси, в следствие натрупването на нови ензимни молекули по повърхността на ковалентно свързаната тирозиназа.



Фиг. 44. QCM профил на имобилизация на тирозиназа *in situ* при скорост на помпата 1,2 rpm.

За потвърждение на тази хипотеза е променена скоростта на подаване на ензимния разтвор и проследен процеса. На фигура 45 е представена кривата от получения QCM профил на имобилизация на тирозиназа *in situ* при скорост 1 rpm на помпата. На фигурата е представен профила на имобилизацията (а) и адсорбционно/десорбционните процеси (б), настъпващи след запълване на повърхността на резонатора с ковалентно свързан ензимен слой.

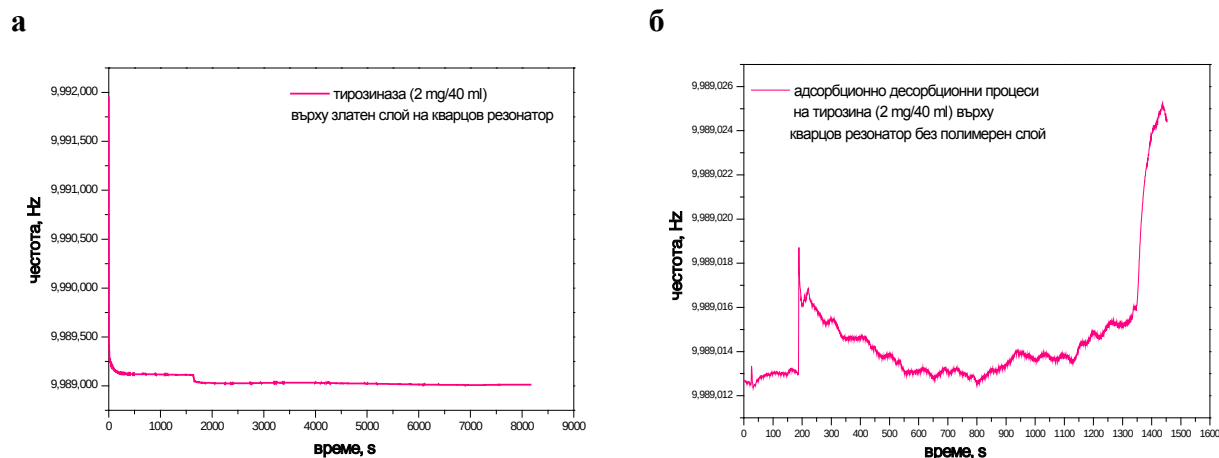


Фиг.45. QCM профил на имобилизация на тирозиназа *in situ* при скорост на помпата 1 rpm (а). Адсорбционно/десорбционни процеси на повърхността на кварцов резонатор с полимерен слой и имобилизирана тирозиназа (б).

При скорост на помпата 1 rpm, процесът на имобилизация се удължава до 4,40 часа. Разликата в честотите от началото до края на процеса, показващ масата на отложения ензимен слой по повърхността на резонатора е от порядъка на 400 Hz. В сравнение с QCM профила на предходната фигура, ясно се очертава разликата в кривите, описващи

понижението на честотите. При по-ниски скорости на подаване на ензимния слой, ходът на кривата е по-плавен. На същата фигура 45, графика (б) изобразява колебанията в честотите, които са идентични на профила от предходния експеримент (фиг.44). Наблюдават се неравномерни понижения и повишения на честотите, което дава основание за извода, че на повърхността протичат процеси, повлияни от скоростта на преминаващия флуид. При настъпване на адсорбционен/десорбционен процес, регистрирани с промяна в честотите на резонатора, скоростта на помпата е променена на 1,5 rpm. При отмиване на несвързаните ензимни молекули, в следствие на повишената скорост на флуида се достига отново до крайните регистрирани честоти, при които имаме ковалентно свързване на ензимните молекули.

При повтарящи се на предходните експерименти условия е пропускан разтвор на тирозиназа през повърхността на кварцов резонатор, без предварително отливане на полимер. На фигура 46 са представени QCM профилите от проведения експеримент.



Фиг.46. QCM профил на отлагане на тирозиназа *in situ* при скорост на помпата 1rpm (а). Адсорбционен/десорбционен процес върху кварцов резонатор, без полимерен слой (б).

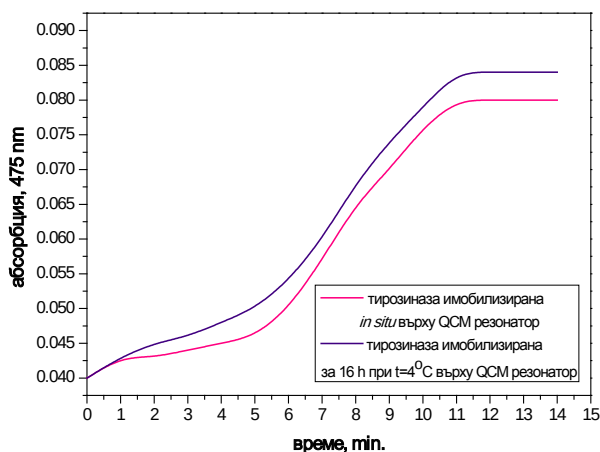
Графиката по-горе показва, че преминаването на ензимния разтвор през системата започва на 40 минути. За период от 2,30 часа от пропускането на ензимния разтвор се наблюдава разлика в честотите едва 150 Hz и подчертана линейност на QCM профила. Това може да се дължи на натиска, който оказва ензимният разтвор при преминаването си през повърхността на резонатора. Наблюдава се така наречения в QCM ефект на липсващата маса -“missing effect”. Този ефект се дължи на остатъчната маса на преминаващия през повърхността на кварцовия резонатор флуид. В таблица 18 са обобщени данните от проведените експерименти.

Таблица 18. QCM параметри от имобилизация на тирозиназа *in situ*

носител	дебелина на полимерния слой (nm)	диаметър на златния слой върху резонатора (d=mm)	имобилизация <i>in situ</i>	време за имобилизация (h)	разлика в честотите след завършване на имобилизацията (Hz)	свързани ензимни молекули (mol/cm ²)
АА	12	3	тирозианаза	3,20 при 1,2 rpm 4,40 при 1,0 rpm	400	8.10 ⁻¹²
златен слой без полимер	-	3	тирозианаза	2,30 при 1rpm	150	3.10 ⁻¹² отложени с адсорбция

За сравнение между имобилизацията, проведена с QCM и стандартната имобилизация, резонатор с нанесен полимерен слой е поставен в ензимен разтвор на тирозиназа за 16 часа, при t=4°C.

Активността на имобилизираната *in situ* тирозиназа върху кварцов резонатор за QCM (d=3 mm) е определена спектрофотометрично при $\lambda=475$ nm със субстрат L-DOPA (800 μ M). На фигура 47 е представена графичната зависимост на абсорбцията спрямо времето.



Фиг.47. Сравнение хода на реакцията, изразена в абсорбция спрямо времето, между имобилизирана върху QCM резонатор тирозиназа *in situ* и имобилизация за 16 h.

Графиката показва равномерно повишение на абсорбцията във времето. Ходът на кривите е идентичен, което показва приблизително еднакво количество свързан ензим към повърхността на кварцовия резонатор. Специфичната активност на имобилизираните ензими е определена спектрофотометрично със субстрат L-тирозин (1.10^{-3} M) при $\lambda=280$ nm за 10 минути. Данните са представени в таблица 19.

Обобщените в таблицата резултати показват близки стойности на специфичната и относителна активност на имобилизирания ензим. Това позволява да бъдат сравнени не само методите за имобилизация, а да се направи извод за влиянието на полимерния слой върху каталитичната активност на имобилизирания ензим.

Таблица 19. Сравнение между имобилизация *in situ* на тирозиназа с QCM и за 16 h, при $t=4^{\circ}\text{C}$.

носител	дебелина на полимерния слой (nm)	диаметър на златния слой върху резонатора (d=mm)	време за имобилизация (h)	количество свързан белтък (mg/ml)*	специфична активност (U/ml)*	относителна активност (%)
АА	12	3	4,40 при 1,0 rpm	$\sim 5 \cdot 10^{-5}$	24,3	5,81
АА	12	3	16 при 4°C	$\sim 5 \cdot 10^{-5}$	25	5,98
тирозианаза		-	-	$3,7 \cdot 10^{-4}$	418	-

*Пояснението по таблицата е идентично на това, дадено за табл. 21.

Получените данни позволяват да се допусне, че ефективността на имобилизация, протичаща за 4,40 часа с QCM е идентична с тази за 16 часа при $t=4^{\circ}\text{C}$.

Резултатите, получени при изследванията със SPR и QCM спомагат за по-доброто разбиране механизма на свързване между ензим/носител и дават възможност да бъдат преразгледани условията за имобилизация и количествата ензим, включвани в процеса.

Дискусия

За първи път са синтезирани нови трикомпонентни хибридни мембрани по зол-гел метод. Новите хибридни материали съдържат различни силициеви прекурсори, целулозни производни и съполимер на акриламид/акрилонитрил като носител на функционални групи. Получените мембрани са прозрачни, пластични, с висока механична стабилност, което е необходимо условие да бъдат с желаната форма и размер, съобразено с изискванията на експеримента. Наблюдаваните със SEM и оптична микроскопия повърхности показват висока порьозност и наличие на сферични образувания с размери от 1 до 100 μm . В присъствието на целулозни производни, както и на други органични и синтетични полимери се създава предпоставка за формирането на пори. Съществува зависимост между количеството органична компонента, включена в зола при синтез на хибридни материали и големината на формиращите се пори. При нарастване на количеството органичен компонент се формират повърхности с по-големи пори.

Новите хибридни мембрани са изследвани спрямо моделни ензими – глюкозооксидаза и пероксидаза. Тези ензими са гликопротеини. Това позволява да се свързват ковалентно с функционалните групи на предварително окислените въглехидратни остатъци.

Условията на окисление са така подбрани, че да се съхрани ензимната активност и да се получат достатъчно реактивоспособни групи. При прилагане на по-високи концентрации на окисляващ реагент съществува опасност от загуба на активност. Предимството на

ковалентната имобилизация с предварително окисление на въглехидратните остатъци е, че не се променя конформацията на ензимната молекула и свързването става винаги извън активния център. Някои последни изследвания посочват успешен метод на свързване към мембрани от дендримери и други носители, с последващо конструиране на биосензори за глюкоза.

При свързването на глюкозооксидаза и пероксидаза към хибридни мембрани е изследвана възможността за конструиране на амперометричен биосензор. Ковалентното свързване на ензима към съполимер на акриламид/акрилонитрил се осъществява между амидните групи на съполимера и окислените въглехидратни остатъци на ензима. Този метод е приложен успешно в предишни изследвания на български и чужди автори.

След проведената имобилизация получените ензимни конюгати са с висока относителна активност както за глюкозооксидаза, така и за пероксидаза. За глюкозооксидаза резултатите са: 90,11% TMOS/CAB/AA, 36,48 % TEOS/CAB/AA, а за пероксидаза - 57,23% TMOS/CAB/AA, 31,55% TEOS/CAB/AA.

От направените предварителни изследвания за ензимната активност на глюкозооксидазата и пероксидазата, имобилизирани към хибридните мембрани, съдържащи TMOS/CAB, експерименталните данни показват по- висока относителна активност в сравнение с TEOS/CAB. Хибридните мембрани, синтезирани с прекурсор TMOS/CAB не показват промяна на рН оптимума на ензимно действие в сравнение със свободните ензими.

При изследване на рН оптимума трябва да се имат предвид влиянието, което оказват матриците върху системата матрица – ензим. Отместването на рН оптимума на ензима настъпва в следствие на неравномерното разпределение на протоните, предизвикано от положителните или отрицателни заряди на използвания носител, както и наличието на значителни дифузионни ограничения. Това е вероятната причина за отместване на рН оптимума на действие на ензимите, имобилизирани върху хибридни мембрани, съдържащи TEOS/CAB/AA. В същността си то е незначително с характерния за имобилизирани ензими широк профил на кривата. Слабото отместване на рН профила предполага неутралния характер на матрицата, което се явява благоприятен фактор за имобилизация на различни ензими, в зависимост от техния клас и специфика на каталитично действие.

Направено е сравнение между каталитичните свойства на имобилизираните ензими върху хибридни мембрани, съдържащи TMOS/CAB/AA и TEOS/CAB/AA. Мембраните с TMOS/CAB/AA показват по-добри резултати, което съвпада с литературните данни.

Подбраната хибридна мембрана на основата на TMOS/CAB/AA с имобилизирана глюкозооксидаза и е прикрепена към амперометричен биосензор.

Времето за отговор на амперометричния биосензор е 45 секунди. Получен е широк линейен диапазон на измерване - 0,6-20 mM. Стандартната крива е с широк линейен диапазон и с висок коефициент на корелация, напълно удовлетворяващ един аналитичен метод. Върху показателите на биосензора влияние оказват характеристиките на мембраната – равномерно разпределение на свързания ензим и дебелина на мембраната, които са основен фактор за бързодействието на сензора.

Новосинтезираните мембрани са модифицирани, като са променени източника на силициев диоксид и целулозното производно. Въпреки че TEOS и TMOS са най-широко разпространените прекурсори, ETMS и MTES показват по-добра способност за образуване на тънки филми и мембрани. Те имат по-добра пластичност и прозрачност, което е едно от основите изисквания на експеримента.

Модифицираните мембрани са изследвани по отношение на биосъвместимост с пероксидаза. Получените резултати за специфична и относителна активност са много добри, като най-висока активност показват мембраните, съдържащи ETMS/CAP/H/AA - 50,29% и MTES/CAP/H/AA-47,66%. Стойностите за получените активности са много близки, което показва, че двете матрици са равностойни като носители. По-ниски стойности за специфична и относителна активност показват мембраните съдържащи ETMSCAP/L/AA и MTES/CAP/L/AA. Това е показателно за свързването на ензима към носителя. В този случай не зависи от вида на силициевия прекурсор, а от целулозните производни. Интересни са температурните профили на имобилизираната пероксидаза. Въпреки по-ниската специфична и остатъчна активност мембраните, съдържащи ETMS/CAP/L/AA и MTES/CAP/L/AA показват по-висок спрямо другите носители температурен оптимум от 45 °C. С целулозни производни по зол-гелен метод други автори постигат температурен оптимум при 55° C за имобилизирана тирозиназа.

При имобилизация на тирозиназа по-висока относителна активност имат мембраните, съдържащи целулозен ацетат пропионат с висока молекулна маса – ETMS/CAP/H/AA – 54,5% и MTES/CAP/H/AA – 80,1 % спрямо субстрат L-тирозин. Както и при изследванията с пероксидаза, резултатите показват по-висока относителна активност за носителите, съдържащи целулозен ацетат пропионат с висока молекулна маса.

Изчислените стойности на K_m при субстрат L-тирозин за имобилизирана тирозиназа са три пъти по-високи (ETMS/CAP/H/AA, $K_m = 1,6 \cdot 10^{-3}$ M), (ETMS/CAP/L/AA, $K_m = 1,5 \cdot 10^{-3}$ M), (MTES/CAP/H/AA, $K_m = 1,7 \cdot 10^{-3}$ M) и (MTES/CAP/L/AA, $K_m = 1,6 \cdot 10^{-3}$ M) спрямо свободния ензим ($K_m = 0,5 \cdot 10^{-3}$ M). Изменението в стойностите на K_m за имобилизирания ензим може да се дължи на конформационни изменения в ензимната молекула, а също така на дифузионни ограничения или масопреносни процеси, водещи до понижение скоростта на формиране на ензим-субстратния комплекс.

При изследване на рН зависимости, изменението в оптимумите, освен от вида на матрицата, са свързани и с вида на субстрата. За субстрат L-тирозин рН оптимумът на тирозиназа е 6,0. Съществува възможност да бъде контролирана активността на тирозиназата при добавяне на органични разтвори като изопропанол и др. Това позволява да се постигне висока специфична и остатъчна активност на ензима в желан диапазон на рН.

В литературата се посочват методи за имобилизация в силициево-диоксидна хибридна матрица чрез адсорбция, включване в обем или по техниката „layer-by-layer”. Обикновено тези методи са свързани с определени дифузионни ограничения, които при ковалентната имобилизация не се наблюдават. Така например, свързването на големи количества ензим към носителя, но с ниска каталитична активност, е наблюдавано спрямо матриците на основата на TEOS/CAP/H/AA и TEOS/CAP/L/AA и TMOS от същата група. Аналогични

случаи са докладвани и от други автори. Те обясняват ниската каталитична активност при висока концентрация на белтък с високата порьозност на мембраните, които адсорбират голямо количество белтък. Също така се проявява взаимнозапречащ ефект, който си оказват ензимните молекули.

Конструираният оптичен биосензор на основата на ковалентно имобилизирана тирозиназа върху мембрана, съдържаща ETMS/CAP/H/AA показва широк линейен диапазон на действие - $2,2\text{--}58 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ за L-тирозин, кратко време за отговор до 60 секунди, добра възпроизводимост в изследвания период от 30 дни и корелационен коефициент на стандартната права $R^2=0,9397$. Относителното стандартно отклонение е R.S.D.% ($n=10$) = 3,13. Резултатите, получени за биосензор на основата на хибридна мембрана, съдържаща MTES/CAP/H/AA са аналогични.

При изследване имобилизираната тирозиназа спрямо субстрат L-DOPA, получените резултати за относителна активност са много близки за всички изследвани матрици. Най-висока стойност на относителна активност има матрицата, съдържаща ETMS/CAP/H/AA – 76,48% и останалите матрици както следва: ETMS/CAP/L/AA -75,29%, MTES/CAP/H/AA – 74,10% и MTES/CAP/L/AA – 72,68 %. Стойности на K_m при субстрат L-DOPA за имобилизирана тирозиназа са: (ETMS/CAP/H/AA, $K_m= 12,7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$), (ETMS/CAP/L/AA, $K_m= 3,9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$), (MTES/CAP/H/AA, $K_m= 8,4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) и (MTES/CAP/L/AA, $K_m= 14,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$) спрямо свободния ензим ($K_m= 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$).

Конструиран е биосензор с оптични влакна и кислородна сонда за измерване консумацията на кислород в хода на реакцията спрямо субстрати L-DOPA и фенол.

Конструираният оптичен биосензор, измерващ консумацията на кислород на основата на ковалентно имобилизирана тирозиназа показва широк линейен диапазон на действие от $0,8\text{--}8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ за L-DOPA и за фенол, кратко време за отговор до 30 секунди, добра възпроизводимост в изследвания период от 30 дни и корелационен коефициент на стандартната права $R^2=0,9224$ за носител MTES/CAP/L/AA. Определеното стандартно отклонение е R.S.D.% ($n=10$) = 2,01. Резултатите, получени при измерване консумацията на кислород спрямо субстрат фенол, са близки до получените със субстрат L-DOPA, което е показателно за сродството на ензима към субстрата.

Прилагането на двуензимна система тирозиназа/POD повишава каталитичната активност на ензима, а от там се подобряват и работните параметри на биосензора. Наблюдава се средно с 33% повишена консумация на кислород за всички изследвани матрици, дори и при ниски субстратни концентрации.

Конструираният оптичен биосензор, измерващ консумацията на кислород на основата на двуензимна система тирозиназа/пероксидаза показва до два пъти по-висока консумация за субстрат L-DOPA, в сравнение с оптичния биосензор само с имобилизирана тирозиназа. Времето за отговор на сензора е 15 секунди при корелационен коефициент на стандартната права $R^2=0,9437$ за носител MTES/CAP/H/AA и R.S.D. % ($n=10$) = 1,68. За матрица на основата на MTES/CAP/L/AA $R^2=0,9139$ и R.S.D. % ($n=10$) = 1,73.

Новите биосензори показват отлична оперативна стабилност както при измерване изменението на абсорбцията спрямо времето, така и при определяне консумацията на

кислород в хода на реакцията. Основно предимство на сензора е високата чувствителност по отношение консумацията на кислород при ниски субстратни концентрации.

Получените резултати са сравнени с тези на други автори и обобщени в таблицата по-долу (табл. 20).

Таблица 20. Сравнение между различни биосензори с имобилизирана тирозиназа по данни от други автори.

	вид на биосензора	субстрат	линеен диапазон	време за отг. (s)	отн. ст. откл. R.S.D. %	n	опер-на стаб.	лит.
1	Оптичен биосензор с имобилизирана тирозиназа върху хибридни мембрани (измерване на абсорбция при 280 nm).	L-тирозин	$2,2 - 58 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	60	3,13	10	30 дни	наст. работа
2	Оптичен биосензор с имобилизирана тирозиназа върху хибридни мембрани (измерване консумация на кислород).	L-DOPA	$0,8 - 8,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	30	2,01	10	30 дни	наст. работа
3	Оптичен биосензор с имобилизирана мултиензимна система тирозиназа/POD върху хибридни мембрани (измерване консумация на кислород).	L-DOPA	$0,8 - 8,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	15	1,68	10	30 дни	наст. работа
4	Оптичен биосензор с имобилизирана мултиензимна система тирозиназа/POD върху хибридни мембрани (измерване на консумация на кислород).	фенол	$0,8 - 8,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	30	1,95	10	30 дни	наст. работа
5	Оптичен биосензор за фенол на основата на хитозан/нафлон/зол-гел мембрани с имобилизиран MBTH.	фенол	$0,5 - 7,0 \text{ mg/L}$	-	8,9	8	90 дни	Abdulah et al, 2006
6	FIA амперометричен биосензор на основата на въглеродни нанотръбички.	фенол	$0,14 - 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	-	-	-	30 дни	Alarcon et al, 2010
7	Електрохимично откриване на фенолни съединения с имобилизирана тирозиназа върху композитен филм от въглеродни многостенни нанотръбички/повърхностно активно вещество.	фенол	$1,5 - 25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	60	-	-	20 дни	Hashemnia et al, 2012
8	Амперометричен биосензор на основата на имобилизирана тирозиназа върху композитен биополимерен филм.	L-DOPA	$5,0 \cdot 10^{-6} - 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	-	-	-	60 дни	Tembe et al, 2006
9	Електрохимичен сензор за L-DOPA на базата на електрод, покрит с оксованадиев филм, приложен за FIA.	L-DOPA	$1,0 \cdot 10^{-6} - 1,0 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	-	3,7	9		Teixeira et al, 2007
10	Спектофотометрично определяне на допамин, леводопа и адреналин със SPR.	L-DOPA	$1,6 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	100	2,5	6	-	Nezhad et al, 2010
11	Електрохимично определяне на L-DOPA в присъствието аскорбинова киселина чрез модифициран със златни наночастици графитен електрод.	L-DOPA	$3,0 - 10 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	-	-	-	25 дни	Jayakumar et al, 2013
12	Електрохимичен биосензор на базата на бор-легиран диамантен електрод с имобилизирана тирозиназа върху модифициран полианилин поливинил-сулфонат композитен филм.	L-тирозин	$2,0 - 10 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	-	-	6	30 дни	Mangombo et al, 2013
13	Електрохимичен биосензор на основата на графенов оксид за определяне на тирозин.	L-тирозин	$5 \cdot 10^{-7} - 2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ $2 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ $3 \cdot 10^{-4} - 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	-	-	3	-	Wei et al, 2012

След сравнение с работите на други автори може да се направи извода, че конструираните от нас биосензори са с висока оперативна стабилност, добра възпроизводимост на резултатите и широк линеен диапазон. Също така конструираните

оптични биосензори позволяват провеждане на експресни измервания на реални проби от отпадъчни води, храни и други.

Зол-гелните хибридни матрици са термично стабилни, химически инертни и запазват високата каталитична активност на ензима.

Показателно за влиянието на матрицата е изследването на имобилизирана тирозиназа спрямо инхибитор бензоена киселина. При построяване на зависимостите V от S в координати на Лайнуивийър-Бърк е доказано неконкурентно инхибиране, което съвпада с други докладвани работи. При сравнение спрямо свободен ензим, резултатите показват, че матрицата оказва влияние върху степента на инхибиране на ензима в присъствието на бензоената киселина.

Изхождайки от публикуваните в литературата данни, че наличието на хидрофобни остатъци е важно за инхибиторната способност на пептидите, спрямо тирозиназата и отчитайки факта, че изследваните в дисертацията пептиди съдържат в структурата си Leu- β -Ala-Val, получените от нас резултати напълно корелират с литературните данни. Наличието на Asp или Glu остатъци е неблагоприятно за инхибиторната активност спрямо тирозиназата. От получените от нас резултати става ясно, че това тяхно поведение се дължи на наличието на свободна карбоксилна функция в страничната верига на Asp или Glu. Това е видно, тъй като изследваните от нас пептидни инхибитори съдържат Asp, но нейната странична карбоксилна група е свързана към Nor-галантаминовата молекула.

Важен параметър на имобилизацията е стабилност при съхранение на системата ензим/носител. Иmobилизираната тирозиназа е съхранявана във фосфатен буфер (50 mM, pH=6,5) при $t = 4^{\circ}\text{C}$ в продължение на 80 дни. При същата температура е съхранявана и свободната тирозиназа. Резултатите показват, че активността на имобилизирания ензим намалява по-бавно, в сравнение със свободния ензим. Свободният ензим губи активност за период от 4 седмици. На 80-я ден от съхранението максималната активност на свободния ензим достига до 10 %. За имобилизирана тирозиназа върху матрици, съдържащи MTES/CAP/H/AA изменението достига до 75%, а за ETMS/CAP/H/AA до 50% на 80-я ден. Получените резултати са идентични на докладваните в от други автори.

За конструирането на биосензори с добри работни параметри, особено важно е получаването на мембрани и покрития с точно определена дебелина на слоя. Оптималните параметри на всеки един носител се определя индивидуално за самия него и получените зависимости могат да бъдат отнесени към други материали само с определена степен на приближение, но никога с пълно съвпадение на резултатите. Това налага индивидуален подход към носителя при използване на spin-coating метод, както и при избор на имобилизация.

С помощта на SPR с висока точност е възможно да се установи дебелината на получените покрития. Този метод позволява да бъде определена дебелината на формирания на повърхността ензимен слой, което е обект на бъдещо изследване. Разпределението на ензимните молекули по повърхността на носителя и ефективното им свързване с функционалните групи спомага за подобряване работните параметри на конструираните биосензори.

Прилагането на QCM дава допълнителни възможности при изследване на ензими, клетки и други молекули, отлагани от разтвор върху повърхността на кварцовия резонатор. Чувствителността на метода към вискозитета на преминаващите флуиди и отложената маса може да бъде причина за отклонение от линейната зависимост. Този ефект се нарича Сауърбрей връзка или „ефект на липсващата маса“ („missing effect“) и понякога създава ограничения при прилагането на QCM в биосензорната техника. Съчетаването на QCM и SPR или други методи позволява получаването на допълнителна информация за взаимодействията биомолекули/носител и биомолекули/субстрат.

Със SPR са определени оптималните параметри на тънки полимерни слоеве от съполимер на акриламид/акрилонитрил. Определени са зависимостите между броя обороти при отливане по spin-coating метод и дебелините на получените тънки слоеве (12 nm при 3000 rpm). С QCM е проследена *in situ* имобилизация на тирозиназа. Получените резултати са сравнени с имобилизация върху кварцов резонатор, без полимерен слой. Показателна е разликата в честотите, зависи от количеството отложен ензим върху полимерен слой и резонатор без полимер. Върху полимерния слой понижението достига до 400 Hz, което отговаря на $8 \cdot 10^{-12}$ mol/cm² отложени ензимни молекули. При резонатор без полимерен слой понижението в честотите е 150 Hz, което отговаря на $3 \cdot 10^{-12}$ mol/cm² отложени ензимни молекули. Съществена е разликата във вида на свързване на ензимните молекули. При резонатор с нанесен полимерен слой свързването е ковалентно, докато върху чистия златен слой на резонатора ензимните молекули се отлагат на повърхността чрез адсорбция. Доказано е, че ковалентна имобилизация за 4,40 часа в режим на QCM при контролирано подаване на ензимния разтвор е също толкова ефективна, както и ковалентна имобилизация за 16 часа, при t=4°C. Резултатите, получени при изследванията със SPR и QCM спомагат за по-доброто разбиране механизмите на свързване между ензим/носител и дават възможност да бъдат преразгледани условията за имобилизация и количествата ензим, включвани в процеса. В таблица 21 са сравнени резултатите от настоящата работа с тези на други автори.

Таблица 21. Сравнение между количеството свързана тирозиназа чрез QCM по данни от други автори.

носител	дебелина на полимерния слой (nm)	диаметър на златния слой върху резонатора (d=mm)	имоб. <i>in situ</i>	метод за имоб.	разлика в честотите след завършване на имобилизацията (Hz)	свързани ензимни молекули (mol/cm ²)	лит.
съполимер на акриламид/акрилонитрил	12	3	тирозилаза	ковалентна	400	$8 \cdot 10^{-12}$	наст. работа
квартенизиран хитозан	-	3	тирозилаза	слой по слой	250	$1.73 \cdot 10^{-13}$	Guerente et al, 2005
златни наночастици функционализирани с меркаптодекааноинова киселина	-	3	тирозилаза		250	-	Gomes et al, 2010

Новоконструирани биосензори са охарактеризирани спрямо: време за реакция, възпроизводимост на резултатите, обхват на линейния диапазон и оперативна стабилност.

Резултатите показват висока степен на стабилност, кратко време за отговор, висока чувствителност и селективност, както и по-широк линеен диапазон, в сравнение с традиционните аналитични методи. Прилагането на хибридни материали, получени по зол-гелен метод позволява да бъдат конструирани бисензори с по-добри параметри по отношение на биосъвместимост, по-дълъг период на експлоатация и мобилност.

Резултатите от нашите изследвания при конструирането на оптични биосензори показват добра съвместимост между носителя и ензимите, без промяна конформацията на ензимните молекули и ковалентно свързване винаги извън активния му център.

Основни изводи и приноси на дисертационния труд

1. По зол-гелен метод са синтезирани група нови трикомпонентни хибридни мембрани, на основата на SiO_2 прекурсори, целулозни производни и съполимер на акриламид/акрилонитрил.
2. Проведени са изследвания за биосъвместимост и каталитична активност спрямо моделни ензими – глюкозооксидаза и пероксидаза на хибридни мембрани на основата на TEOS/CAB/AA и TMOS/CAB/AA.
3. Изследвана е имобилизацията на пероксидаза върху хибридни мембрани на основата на ETMS/CAP/H/AA и MTES/CAP/H/AA и техни аналози с целулозен ацетат пропионат с ниска молекулна маса (ETMS/CAP/L/AA и MTES/CAP/L/AA).
4. Изследвана е имобилизацията на тирозиназа върху хибридни мембрани, на основата на ETMS/CAP/H/AA и MTES/CAP/H/AA и техни аналози с целулозен ацетат пропионат с ниска молекулна маса (ETMS/CAP/L/AA и MTES/CAP/L/AA).
5. Конструиран е оптичен биосензор с кислороден сензор на основата на имобилизирана двуензимна система тирозиназа/пероксидаза.
6. Доказано е, че новосинтезирани инхибитори на основата на модифициран с пептидна верига галантамин, действат като безконкурентни инхибитори спрямо тирозиназа.
7. Чрез SPR са определени оптималните параметри на тънки полимерни слоеве от съполимер на акриламид/акрилонитрил. Проследена е чрез кварцово кристална микровезна *in situ* имобилизацията на тирозиназа.

Приноси

1. За първи път по зол-гелен метод са синтезирани трикомпонентни хибридни мембрани на основата на целулозни производни, съполимер на акриламид/крилонитрил и различни източници на силициев диоксид (TEOS, TMOS, ETMS и MTES).
2. Конструирано е устройство за имобилизация на ензими, което позволява паралелна имобилизация на два и повече ензима, оптимизация на количествата ензим, вложени в процеса, оптимизация на времето за имобилизация и мобилност.
3. Конструирани са оптични биосензори на основата на имобилизирана към новите хибридни мембрани тирозиназа и двуензимна система тирозиназа/пероксидаза. Проведени са приоритетни изследвания върху потенциалното практическо приложение на новите биосензори за определяне на фенол и допамин в отпадъчни води, храни и други реални проби.
4. За първи път са получени тънки (до 300 nm) и ултратънки (12 nm) полимерни покрития от съполимер на акриламид/акрилонитрил. Доказана е ефективна ковалентна имобилизация на тирозиназа за 4,40 часа.

СПИСЪК

на публикациите по дисертационния труд на инж. Спаска Янева

1. Lyubov Yotova, **SpaskaYaneva**, Dessislava Marinkova, Stephan Serfaty, Co-immobilization of peroxidase and tyrosinase onto hybrid membranes obtained by the sol-gel method for the construction of an optical biosensor, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27 (3), **2013**, 3885-3889, **IF: 0,760**.
2. Lyubov Yotova, **Spaska Yaneva**, Silica-based hybrid materials as biocompatible coatings for xenobiotics sensors, *Bulgarian Chemical Communication*, **2013**, **IF: 0,283**. *In press*.
3. Lyubov Yotova, **SpaskaYaneva**, Dessislava Marinkova, Biomimetic nanosensors for determination of toxic compounds in food and agricultural products: paper review, *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*, 48, (3), **2013**, 215-227.
4. Spaska Yaneva, Desislava Marinkova, Lyubov Yotova, Biserka Samuneva, Immobilization of Biocatalysts and Cells on Hybrid Membranes Syntheses on Sol-gel Method, *Bioautomation*, 8, (1), **2007**, 172 – 183.

СПИСЪК

докладите по дисертационния труд, изнесени на национални и международни конференции, с участието на инж. Спаска Янева

2013

1. **Spaska Yaneva**, Lyubov Yotova, Construction of optical biosensors for detection of phenolic compounds, *X Научна постерна сесия – 60 години ХТМУ, май 2013*.
2. **Spaska Yaneva**, Lyubov Yotova, Tzvetan Velinov – Smart Fiber Optic and Acoustic Biosensors with Immobilized Enzymes on Thin Polymer Films, *Национална научна конференция по случай 60-години ХТМУ, юни 2013*.

2012

3. **Spaska Yaneva**, Lyubov Yotova, Tzvetan Velinov, Covalent bonded tyrosinase: towards biosensors for xenobiotics compounds, *IX Научна постерна сесия – 100 години от рождението на професор д-н Никола Коларов, май 2012*.
4. **Spaska Yaneva**, Lyubov Yotova, Lyubomir Vezencov, Liliya Ilieva, Dancho Danalev, Biosensors for determination of tyrosinase activity with potential biomedical application for diagnosis of malignant melanoma, *IX Научна постерна сесия – 100 години от рождението на професор д-н Никола Коларов, май 2012. Наградена*

5. Lyubov Yotova, **Spaska Yaneva**, Amany Fathy Kihodier, Biosensor design for xenobiotics determination in wastewater, *7th Chemical Engineering Conference for Collaborative Research in Eastern Mediterranean Countries – EMCC7, Corfu, Greece, 26.04- 01.05. 2012.*
6. Lyubov Yotova, **Spaska Yaneva**, Tzvetan Velinov, Silica –based hybrid materials as biocompatible coatings for xenobiotics sensors, *Fourth National Crystallographic Symposium with International Participation, November 1-3, 2012, Sofia, Bulgaria.*

2011

7. Hend Said, **Spaska Yaneva** Lyubov Yotova, Synthesis of membranes for optical Biosensor design and phenol derivatives detection – biomedical application, *VIII Научна постерна сесия, 18 май 2011, ХТМУ, София.*
8. Nourlhoda Medhat, **Spaska Yaneva**, Lyubov Yotova, Studying properties of glucose oxidase immobilized onto sol-gel hybrid membranes, *VIII Научна постерна сесия, 18 май 2011, ХТМУ, София.*
9. **Spaska Yaneva**, Lyubov Yotova, Design of optical biosensors for xenobiotics detection, *VIII Научна постерна сесия, 18 май 2011, ХТМУ, София.*
10. **Spaska Yaneva**, Lyubov Yotova, *7th National Conference on Chemistry; International Conference on Green Technology and Environmental Protection, 26-29. 05. 2011, Sofia, Bulgaria.*
11. Lyubov Yotova, **Spaska Yaneva**, Sol-gel films containing biological recognizing elements for optical biosensors, *The 5th Balkan Conference on Glass Science & Technology; The 17th Conference on Glass and Ceramics 25.09. – 29.09.2011, Nessebar, Bulgaria.*
12. **Spaska Yaneva**, Lyubov Yotova – Covalent co-immobilization of tyrosinase and horseradish peroxidase on hybrid membranes syntheses by sol-gel method, *International Workshop «Implementation of Nanomembrane Technology in the Pharmaceutical Industry» 9-10 September 2011 UCTM– Sofia, Bulgaria.*

2010

13. **Spaska Yaneva**, Lyubov Yotova – Laccase and tyrosinase – blue enzymes for “green” chemistry, *VII – Научна постерна сесия за млади учени с международно участие на ХТМУ, София, 19 май, 2010 г.*