

DOI 10.29254/2077-4214-2024-3-174-333-340

UDC 543.06 + 577.15 + 543.555

Dybko S. M., Rieznichenko L. S., Gruzina T. G.

ELECTROACTIVE COMPLEXES OF GLUCOSE OXIDASE WITH GOLD NANOPARTICLES FOR THE DEVELOPMENT OF ENZYMATIC SENSOR ELEMENTS OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry of NAS of Ukraine (Kyiv, Ukraine)

sdybkova@gmail.com

Gold nanoparticles can be effectively used to enhance the direct electron transfer between enzymes and electrodes, increase the catalytic activity of enzymes, and improve the immobilization of enzymes on the electrode, which significantly increases the sensitivity of enzyme sensors. Therefore, the creation of effective enzyme complexes with gold nanoparticles is an urgent task. The aim of this work was to study the interaction of the glucose oxidase enzyme with gold nanoparticles by investigating the formation of their electroactive complexes. Spectroscopic, electron microscopic, electrophoretic and biochemical methods were used in the work. The contact interaction of glucose oxidase with gold nanoparticles of different sizes was investigated and the ability of such nanoparticles to form electroactive complexes with glucose oxidase at certain concentrations was established. The stimulation of the catalytic activity of glucose oxidase in such electroactive complexes was established. The effectiveness of the study of electroactive complexes of enzymes with metal nanoparticles by agarose gel electrophoresis for the development of sensor elements of enzyme electrochemical biosensors is shown.

Key words: enzyme biosensors, glucose oxidase, gold nanoparticles, electroactive complexes, electrophoresis.

Connection of the publication with planned research works.

The work was carried out within the framework of the project "Intelligent biosensor systems for the determination of some metabolites to control the development of socially important human diseases" (state registration number 0118U005268) of the targeted research programme of the National Academy of Sciences of Ukraine "Smart' sensor devices of the new generation based on modern materials and technologies" and research work: 'Development of environmentally friendly and biocompatible nanomaterials for biomedical purposes" (state registration number 0121U113443).

Introduction.

Metal nanoparticles are actively attracting the attention of researchers for their use in sensor technologies to improve electrode characteristics. It is known that gold nanoparticles are effective catalysts for various electrochemical processes, which leads to their use in the development of amperometric sensors. At the same time, metal nanoparticles are characterised by a pronounced 'size effect' – the dependence of the nature of the effect on biological systems on the size, which is associated with excessive surface energy of nanoparticles due to the uncompensated bonds of surface and near-surface atoms, the proportion of which increases significantly with a decrease in the size of nanoparticles [1].

Gold nanoparticles are used in biosensor studies because they are highly active in the oxidation and reduction of electroactive reporter molecules, enhance electrochemical signals, and promote rapid charge transfer [2-5].

The preparation of electroactive complexes of metal nanoparticles with enzymes is the key to the successful formation of a sensitive element of an electrochemical biosensor based on them [6].

The aim of the study.

To study the interaction of the glucose oxidase enzyme with gold nanoparticles by investigating the formation of their electroactive complexes.

Object and research methods.

Four preparations of spherical gold nanoparticles of different discrete sizes were used in the study. Preparations of gold nanoparticles No. 1 and 2 were obtained by reduction of tetrachloroauric acid (HAuCl₄) with tannin in the presence of potassium carbonate. The sizes of these gold nanoparticles were: No. 1 – 10 nm, No. 2 – 20 nm. Preparation No. 3 was synthesised by the carbonate-citrate method (by reducing tetrachloroauric acid with sodium citrate in the presence of potassium carbonate), with a nanoparticle size of 30 nm. Preparation of gold nanoparticles No. 4 was obtained using CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), the size of the nanoparticles was 30 nm.

We used an enzyme preparation of glucose oxidase (GO) produced by Enzyme (Ladyzhyn, Ukraine), with 1 g of which contains 5,000 units.

To obtain complexes of metal nanoparticles with glucose oxidase, different concentrations of gold nanoparticles in the concentration range of 0.15-2.8 µg/ml per metal were added to 5% of the enzyme preparation. The incubation mixtures contained 0.5 mg of the enzyme preparation of glucose oxidase and the corresponding concentrations of gold nanoparticles. The reaction was carried out in 20 mM phosphate buffer solution (PBS) (pH 7.2).

The electrophoretic separation of nanoparticle complexes with the studied enzyme was carried out in a 5% agarose gel in buffer solution of the following composition: 9 mM Tris-base, 9 mM boric acid, 0.25 mM EDTA, pH 8.3. The sample application buffer consisted of 126 mM Tris-HCl (pH 6.8), 15% phycolic acid, 4% sodium dodecyl sulfate, and 0.002% bromophenol. Electrophoresis was performed at 8 °C. Before electrophoresis, a mix-

ture of 5 µl of application buffer and 20 µl of the sample of glucose oxidase complex with gold nanoparticles was added to each well of the gel. Electrophoresis was performed at 100 V with a gradual increase in voltage from 50 V at the start.

After two hours of electrophoresis under the above conditions, the gel was stained with 0.5% Coomassie 0-250 for 2 minutes, washed thoroughly with distilled water, and electrophoregrams were visualised by blue-stained electrophoretic tracks [7].

The catalytic activity of the enzyme in interaction with gold nanoparticles was studied according to the method [8].

Electron microscopic studies of the contact interaction of glucose oxidase with gold nanoparticles were performed by transmission electron microscopy (JEM-1400, JEOL, Japan) at the Centre for Collective Use of Scientific Instruments of the National Academy of Sciences of Ukraine at the D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine.

Research results and their discussion.

The interaction of glucose oxidase with synthesised gold nanoparticles of different sizes was investigated by optical spectroscopy, transmission electron microscopy and agarose gel electrophoresis.

Glucose oxidase is a component of the sensor elements of enzyme biosensors for the determination of glucose in blood, biotechnological production processes, etc. Glucose oxidase (β-D-glucose:oxygen-1-oxidoreductase; EC 1.1.2.3.4) catalyses the oxidation of β-D-glucose to gluconic acid by using molecular oxygen as an electron acceptor with the simultaneous formation of hydrogen peroxide [10].

The synthesis and study of metal nanoparticle provides for involves their stability in buffer systems traditional for working with enzymes. In this work, 20 mM PBS (pH 7.2) was used. The data of spectrophotometric studies of nanoparticles showed that gold nanoparticles of all four preparations (No1-4) remained stable when added to the system with 20 mM PBS.

The incubation of gold nanoparticles of all the studied preparations No. 1 – 4 with glucose ox-

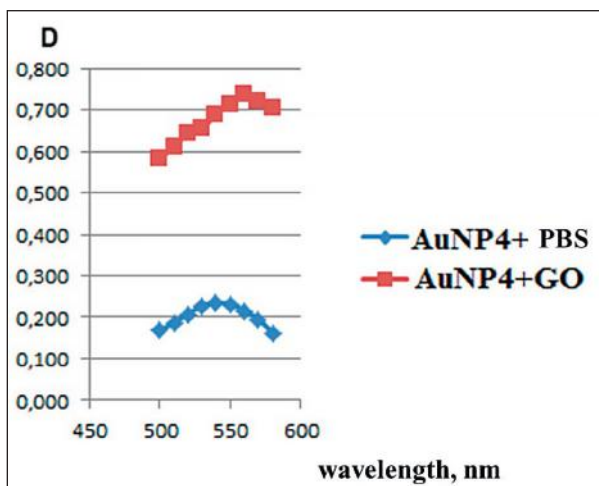


Figure 1 – Absorption spectra of 30 nm gold nanoparticles (No. 4) in 20 mM PBS (AuNP 4+PBS) and after contact interaction with glucose oxidase (AuNP 4+GO).

idase led to the formation of complexes. **Figure 1** shows the absorption spectra of 30 nm gold nanoparticles in 20 mM PBS and after contact with glucose oxidase for the example of preparation No. 4.

As can be seen from **fig. 1**, the peak of the absorption spectrum of the enzyme with nanoparticles shifted to the long-wave region, which confirms the formation of their complex.

Transmission electron microscopy revealed the formation of crystalline structures with significant changes in size (**fig. 2, B**) in preparation No. 4, compared to the native nanoparticle preparation (**fig. 2, A**).

The results of the study revealed the ability of the synthesised gold nanoparticles to form electroactive complexes with glucose oxidase, in this case the nature of the interaction and the possibility of forming a complex by binding nanoparticles to the enzyme strongly depended on the particle size.

The obtained results are consistent with the literature [11], according to which, when complexes between gold nanoparticles and glucose oxidase are formed, the enzyme “wraps” the nanoparticles, which is manifested

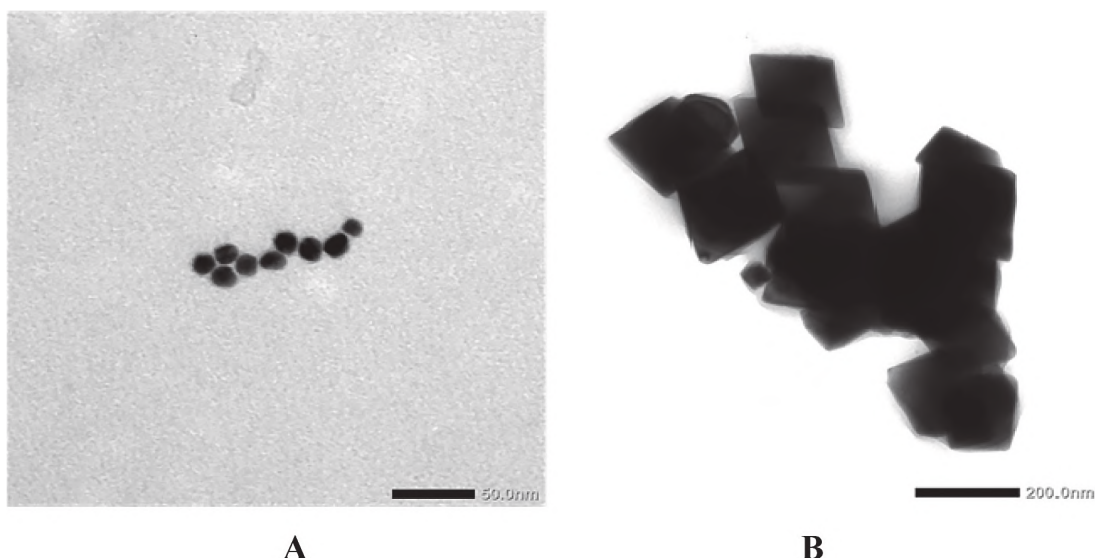


Figure 2 – Electron microscopic studies of gold nanoparticles with an average size of 30 nm in 20 mM PBS (A) and after contact interaction with glucose oxidase (B).

in significant morphological changes in nanoparticles during electron microscopic studies.

The electrochemical interaction of glucose oxidase complexes with synthesised gold nanoparticles of different sizes was investigated by agarose gel electrophoresis, a phenomenon of movement of particles of the dispersed phase in a dispersion medium under the influence of an external electric field. Such complexes of gold nanoparticles with glucose oxidase are presented in **table 1**.

The created complexes of metal nanoparticles with glucose oxidase were tested for their electroactivity and the optimal concentration ratios of the studied nanoparticles and the enzyme were determined.

Fig. 3 shows an electrophoregram of glucose oxidase, marker proteins, and effective gold nanoparticle-enzyme complexes.

It was found that the original enzyme glucose oxidase (**fig. 3**, lane 8) moves in the agarose gel at a lower speed than all the obtained complexes of gold nanoparticles with the enzyme (**fig. 3**, lanes 3-7). Although the weight of the native enzyme is lower than that of the gold nanoparticle-enzyme complexes, its electrophoretic mobility was lower. Obviously, the separation of different complexes of gold nanoparticles with glucose oxidase in an agarose gel depends not only on the weight of the complex but also on other features, in particular, the charge of the gold nanoparticles. It can be assumed that

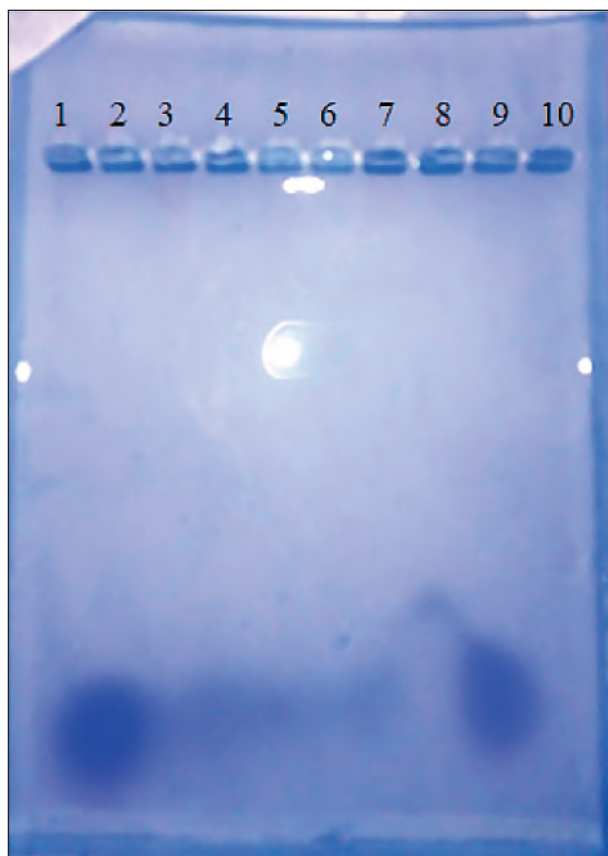


Figure 3 – Electrophoregram of complexes of gold nanoparticles with glucose oxidase (GO): 2 – marker protein of chicken egg, 3 – complex of gold nanoparticles of preparation No. 1 (0.15 µg/ml by metal) with GO, 4 – complex of gold nanoparticles of preparation No. 2 (0.39 µg/ml by metal) with GO, 5 – complex of gold nanoparticles of preparation No. 3 (0.20 µg/ml by metal) with GO, 6 – complex of gold nanoparticles of preparation No. 3 (0.39 µg/ml by metal) with GO, 7 – complex of gold nanoparticles of preparation No. 4 (0.45 µg/ml by metal) with GO, 8 – GO, 9 – marker – BSA.

Table 1 – Experimental complexes of metal nanoparticles with glucose oxidase

Type of complex	Concentration of metal nanoparticles, µg/ml by metal
Glucose oxidase – gold nanoparticle preparation 1	0.15
	0.39
	0.45
	2.80
Glucose oxidase – gold nanoparticle preparation 2	0.15
	0.20
	0.25
	0.95
Glucose oxidase – gold nanoparticle preparation 3	0.20
	0.40
	0.60
	1.90
Glucose oxidase – gold nanoparticle preparation 4	0.15
	0.39
	0.45
	2.80

glucose oxidase in the formed complexes with different concentrations of gold nanoparticles does not neutralise their electrokinetic potential.

Thus, the concentrations of gold nanoparticles presented in **table 2** were optimal for the formation of electroactive complexes with glucose oxidase.

Table 2 – Optimal concentrations of gold nanoparticles for the formation of electroactive complexes of glucose oxidase with gold nanoparticles

Type of complex	Concentration of metal nanoparticles, µg/ml by metal
Glucose oxidase – gold nanoparticle preparation 1	0.15
	0.20
Glucose oxidase – gold nanoparticle preparation 2	0.39
	0.45
Glucose oxidase – gold nanoparticle preparation 3	0.20
	0.39
Glucose oxidase – gold nanoparticle preparation 4	0.45

After studying the electrophoretic mobility, the catalytic activity of the complexes shown in **table 2** was analysed.

It was shown that the activity of glucose oxidase was stimulated by more than 50% under the influence of the studied gold nanoparticles.

It is known from the literature that direct electron transfer between enzymes and electrode surfaces is important for the development of effective biosensor enzyme systems [12]. The presented research results show that gold nanoparticles of different sizes and concentrations, forming electroactive complexes, can enhance the efficiency of direct electron transfer between the enzyme glucose oxidase and electrodes.

Thus, the studies have shown the effect of gold nanoparticles in the studied concentrations on glucose oxidase, which was manifested in morphological changes in gold nanoparticles, changes in the electrophoretic mobility of complexes and an increase in the activity of

glucose oxidase. Electroactive GO complexes with gold nanoparticles can be interpreted as bioconjugates [13], which are promising in terms of the identified patterns and can be used to design electrochemical enzyme sensors to improve their efficiency.

Conclusions.

1. The contact interaction between glucose oxidase and gold nanoparticles of different sizes was investigated, and the ability of such nanoparticles to form electroactive complexes with glucose oxidase at certain concentrations was established.

2. The stimulation of the catalytic activity of glucose oxidase in electroactive complexes of the enzyme with gold nanoparticles of certain concentrations was established.

3. The effectiveness of the study of electroactive enzyme complexes with metal nanoparticles by agarose gel electrophoresis for the development of electrochemical biosensors was shown.

Prospects for further research.

Our research opens up the prospect of designing and creating laboratory prototypes of electrochemical enzyme sensors using gold nanoparticles.

DOI 10.29254/2077-4214-2024-3-174-333-340

УДК 543.06 + 577.15 + 543.555

Дибкова С. М., Резніченко Л. С., Грузіна Т. Г.

ЕЛЕКТРОАКТИВНІ КОМПЛЕКСИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ З НАНОЧАСТИНКАМИ ЗОЛОТА ДЛЯ РОЗРОБКИ ФЕРМЕНТНИХ СЕНСОРНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ БІОСЕНСОРІВ

Інститут біоколоїдної хімії імені Ф. Д. Овчаренка НАН України (м. Київ, Україна)

sdybkova@gmail.com

Наночастинки золота можуть бути ефективно використані для підсилення прямого переносу електронів між ферментами та електродами, підвищення каталітичної активності ензимів, покращення процесу іммобілізації ферментів на електроді, що значно підвищує чутливість ферментних сенсорів. Тому створення ефективних комплексів ферментів з наночастинками золота є актуальною задачею. Метою даної роботи було вивчення взаємодії ферменту глюкозооксидази з наночастинками золота шляхом дослідження формування їх електроактивних комплексів. У роботі використані спектроскопічні, електронно-мікроскопічні, електрофоретичні та біохімічні методи. Досліджено контактну взаємодію глюкозооксидази з наночастинками золота різного розміру та встановлено здатність таких наночастинок у певних концентраціях утворювати електроактивні комплекси з глюкозооксидазою. Встановлено стимуляцію каталітичної активності глюкозооксидази у таких електроактивних комплексах. Показана ефективність досліджень електроактивних комплексів ферментів з наночастинками металів методом електрофорезу в агарозному гелі для розробки сенсорних елементів ферментних електрохімічних біосенсорів.

Ключові слова: ферментні біосенсори, глюкозооксидаза, наночастинки золота, електроактивні комплекси, електрофорез.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота виконана в рамках проекту «Інтелектуальні біосенсорні системи визначення деяких метаболітів для контролю розвитку соціально важливих захворювань людини» (державний реєстраційний номер 0118U005268) цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій та науково-дослідної роботи: «Розробка екобезпечних та біосумісних наноматеріалів біомедичного призначення» (державний реєстраційний номер 0121U113443).

Вступ.

Наночастинки металів активно привертають увагу дослідників щодо їх застосування в сенсорних технологіях з метою покращення характеристик електродів. Відомо, що наночастинки золота є ефективними каталізаторами різноманітних електрохімічних процесів, це обумовлює їх застосування при створенні амперометричних сенсорів. При цьому для наночастинок металів характерним є виражений «розмірний ефект» – залежність характеру впливу на біологічні системи від розміру, що пов'язано із надмірною по-

верхневою енергією наночастинок, обумовленою незкомпенсованістю зв'язків поверхневих і приповерхневих атомів, частка яких істотно зростає із зменшенням розміру наночастинок [1].

Наночастинки золота застосовують у біосенсорних дослідженнях оскільки вони мають високу активність до окиснення і відновлення електроактивних молекул-репортерів, посилюють електрохімічні сигнали та сприяють швидкому переносу заряду [2-5].

Отримання електроактивних комплексів наночастинок металів з ферментами є запорукою успішного формування чутливого елементу електрохімічного біосенсора на їх основі [6].

Мета дослідження.

Визначення взаємодії ферменту глюкозооксидази з наночастинками золота шляхом дослідження формування їх електроактивних комплексів.

Об'єкт і методи дослідження.

В роботі використані чотири препарати наночастинок золота сферичної форми, різних дискретних розмірів. Препарати наночастинок золота № 1, 2 отримані шляхом відновлення золотохлористоводневої кислоти таніном у присутності карбонату калію.

Розміри таких наночастинок золота склали: № 1 – 10 нм, № 2 – 20 нм. Препарат № 3 синтезовано карбонатно-цитратним методом (шляхом відновлення золотохлористоводневої кислоти цитратом натрію у присутності карбонату калію), розмір наночастинок становив 30 нм. Препарат наночастинок золота № 4 отримали із застосуванням у якості відновника ЦТАБ (цетілтриметіламоній бромід), розмір наночастинок становив 30 нм.

У роботі використовували ферментний препарат глюкозооксидази (ГО) виробництва ДП «Ензим» (Львів, Україна), 1 г якого містить 5000 од.

Для отримання комплексів наночастинок металів із глюкозооксидазою до 5% ферментного препарату додавали різні концентрації наночастинок золота у концентраційному діапазоні 0,15-2,8 мкг/мл по металу. Інкубаційні суміші містили 0,5 мг ферментного препарату глюкозооксидази та відповідні концентрації наночастинок золота. Реакцію проводили у 20 мМ фосфатному буферному розчині (рН 7,2).

Електрофоретичне розділення комплексів наночастинок з досліджуваним ферментом проводили у 5% агарозному гелі, в Тріс-боратному буферному розчині наступного складу: 9мМ Тріс-основи, 9мМ борної кислоти, 0,25 мМ ЕДТА, рН 8,3. Буфер для нанесення зразків складався з 126 мМ Тріс-НСІ (рН 6,8), 15% фіколу, 4% додецилсульфату натрію та 0,002% бромфенолу. Електрофорез проводили при 8 °С. Перед проведенням електрофорезу в кожну лунку гелю вносили суміш із 5 мкл буферу для нанесення та 20 мкл досліджуваного зразку комплексу глюкозооксидази з наночастинок золота. Електрофорез проводили при 100 V з поступовим підвищенням напруги від 50 V на старті.

Після двох годин електрофорезу у вказаних умовах гелі фарбували 0.5%-м Кумасі 0-250 протягом 2 хвилин, ретельно промивали дистильованою водою та візуалізували електрофореграми за забарвленими у синій колір електрофоретичними треками [7].

Каталітичну активність ферменту при взаємодії з наночастинок золота досліджували згідно методики [8].

Електронно-мікроскопічні дослідження контактної взаємодії глюкозооксидази із наночастинок золота здійснювали методом трансмісійної електронної мікроскопії (JEM-1400, "JEOL", Японія) у Центрі колективного користування науковими приладами НАН України при Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Результати дослідження та їх обговорення.

Взаємодія глюкозооксидази з синтезованими наночастинок золота різного розміру була досліджена методами оптичної спектроскопії, трансмісійної електронної мікроскопії та електрофорезу в агарозному гелі.

Глюкозооксидаза виступає компонентом сенсорних елементів ферментних біосенсорів для визначення глюкози в крові, біотехнологічних виробничих процесах тощо [9]. Глюкозооксидаза – (β-D-глюкоза:окисген-1-оксидоредуктаза; ЕС 1.1.2.3.4) каталізує окиснення β-D-глюкози до глюконової кислоти шляхом використання молекулярного кисню як акцептора електронів з одночасним утворенням перекису водню [10].

Синтез та дослідження золів наночастинок металів передбачає їх стабільність у буферних системах, традиційних для роботи з ферментами. В даній роботі був використаний 20 мМ фосфатний буфер, (рН 7,2). Дані спектrophотометричних досліджень наночастинок засвідчили, що наночастинок золота усіх чотирьох препаратів (№№ 1-4) залишались стабільними при додаванні в систему 20 мМ фосфатного буферу.

Інкубація наночастинок золота усіх досліджених препаратів №1-4 з глюкозооксидазою призводила до утворення комплексів. На **рисунку 1** на прикладі препарату №4 наведені спектри поглинання наночастинок золота розміром 30 нм у 20 мМ фосфатному буфері та після контактної взаємодії з глюкозооксидазою.

Як видно з **рис.1** пік спектру поглинання ферменту з наночастинок золота зміщувався в довгохвильову область, що підтверджує утворення їх комплексу.

За даними трансмісійної електронної мікроскопії для вказаного вище препарату №4 фіксували утворення кристалічних структур із вираженими змінами розміру (**рис. 2, Б**) порівняно із нативним препаратом наночастинок (**рис. 2, А**).

Результати досліджень дозволили виявити здатність синтезованих наночастинок золота утворювати електроактивні комплекси з глюкозооксидазою, при цьому характер взаємодії та можливість утворення комплексу шляхом зв'язування наночастинок з ферментом виражено залежав від розміру частинок.

Отримані результати узгоджуються із даними літератури [11], згідно яких при утворенні комплексів між наночастинок золота і глюкозооксидазою спостерігається "обгортання" наночастинок ферментом, що проявляється в істотних морфологічних змінах наночастинок при електронно-мікроскопічних дослідженнях.

Електрохімічну взаємодію комплексів глюкозооксидази із синтезованими наночастинок золота різного розміру було досліджено методом електрофорезу в агарозному гелі – явища переміщення частинок дисперсної фази в дисперсійному середовищі під дією зовнішнього електричного поля. Такі комплекси наночастинок золота із глюкозооксидазою представлені у **таблиці 1**.

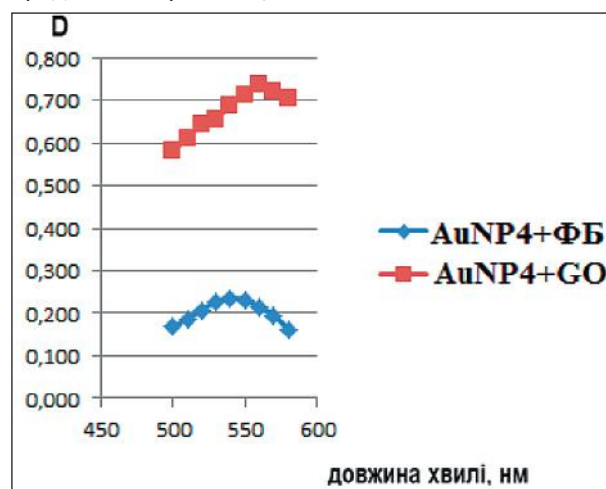


Рисунок 1 – Спектри поглинання наночастинок золота 30 нм (№ 4) у 20 мМ фосфатному буфері (AuNP 4+ФБ) та після контактної взаємодії з глюкозооксидазою (AuNP 4+ГО).

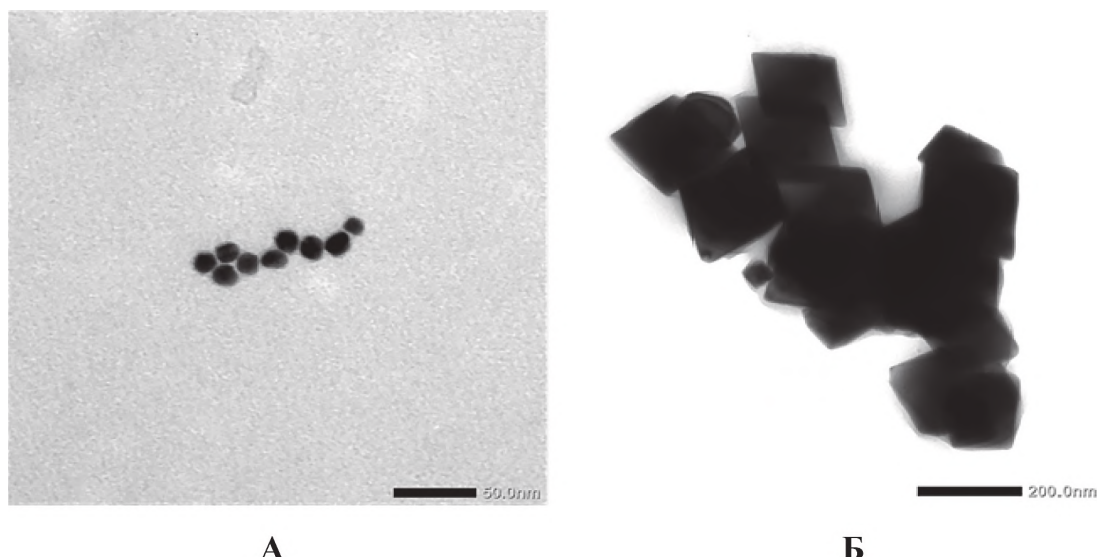


Рисунок 2 – Електронно-мікроскопічні дослідження наночастинок золота середнього розміру 30 нм у 20 мМ фосфатному буфері (А) та після контактної взаємодії з глюкозооксидазою (Б).

Створені комплекси наночастинок металів з глюкозооксидазою перевіряли на їх електроактивність та визначали оптимальні концентраційні співвідношення досліджуваних наночастинок і ферменту.

На **рис. 3** наведена електрофореграма глюкозооксидази, маркерних білків та ефективних комплексів наночастинок золота із ферментом.

Встановлено, що вихідний фермент глюкозооксидаза (**рис. 3**, доріжка 8) рухається в агарозному гелі з меншою швидкістю, ніж усі отримані комплекси наночастинок золота із ферментом (**рис. 3**, доріжки 3-7). І хоча вага нативного ферменту є меншою, ніж комплексів наночастинок золота із ферментом, електрофоретична рухливість його була меншою. Очевидно, розділення різних комплексів наночастинок золота із глюкозооксидазою в агарозному гелі залежить не тільки від ваги комплексу, але і від інших особливостей, зокрема заряду наночастинок золота. Можна припустити, що глюкозооксидаза у сформованих комплексах із різними концентраціями наночастинок золота не нейтралізує їх електрокінетичний потенціал.

Таблиця 1 – Експериментальні комплекси наночастинок металів із глюкозооксидазою

Тип комплексу	Концентрація наночастинок металу, мкг/мл по металу
Глюкозооксидаза-препарат наночастинок золота №1	0,15
	0,39
	0,45
	2,80
Глюкозооксидаза- препарат наночастинок золота №2	0,15
	0,20
	0,25
	0,95
Глюкозооксидаза-препарат наночастинок золота №3	0,20
	0,40
	0,60
	1,90
Глюкозооксидаза-препарат наночастинок золота №4	0,15
	0,39
	0,45
	2,80

Таким чином, концентрації наночастинок золота, представлені у **таблиці 2**, виявилися оптимальними для утворення електроактивних комплексів з глюкозооксидазою.

Після дослідження електрофоретичної рухливості аналізували каталітичну активність комплексів, наведених у **таблиці 2**.

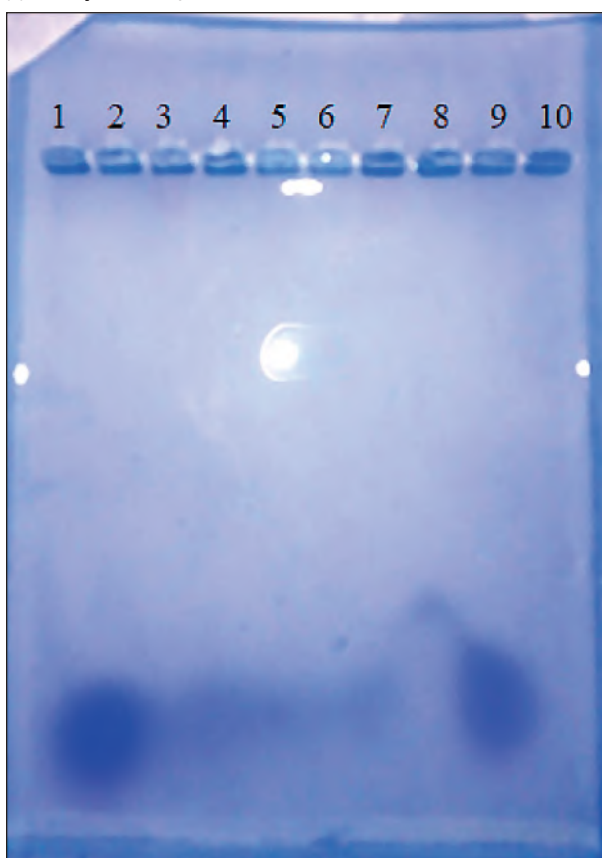


Рисунок 3 – Електрофореграма комплексів наночастинок золота із глюкозооксидазою (ГО): 2 – маркерний білок курячого яйця, 3 – комплекс наночастинок золота препарату № 1 (0,15 мкг/мл по металу) з ГО, 4 – комплекс наночастинок золота препарату № 2 (0,39 мкг/мл по металу) з ГО, 5 – комплекс наночастинок золота препарату № 3 (0,20 мкг/мл по металу) з ГО, 6 – комплекс наночастинок золота препарату № 3 (0,39 мкг/мл по металу) з ГО, 7 – комплекс наночастинок золота препарату № 4 (0,45 мкг/мл по металу) з ГО, 8 – ГО, 9 – маркер – БСА.

Було показано стимуляцію більш ніж на 50% активності глюкозооксидази під впливом досліджених наночастинок золота.

З даних літератури відомо, що пряме перенесення електронів між ферментами і поверхнею електродів є важливим для створення ефективних біосенсорних ферментних систем [12]. Представлені результати досліджень свідчать, що наночастинки золота різного розміру та різних концентрацій, формуючи електроактивні комплекси, можуть підсилювати ефективність прямого переносу електронів між ферментом глюкозооксидазою та електродами.

Таблиця 2 – Оптимальні концентрації наночастинок золота для утворення електроактивних комплексів глюкозооксидази з наночастинами золота

Тип комплексу	Концентрація наночастинок металу (мкг/мл по металу)
Глюкозооксидаза-препарат AuNP №1	0,15
	0,20
Глюкозооксидаза-препарат AuNP №2	0,39
	0,45
Глюкозооксидаза-препарат AuNP №3	0,20
	0,39
Глюкозооксидаза-препарат AuNP №4	0,45

Отже, у проведених дослідженнях показано вплив наночастинок золота в досліджених концентраціях

на глюкозооксидазу, що проявлялося у морфологічних змінах наночастинок золота, зміні електрофоретичної рухливості комплексів та підвищенні активності глюкозооксидази. Електроактивні комплекси ГО з наночастинками золота можна трактувати як біокон'югати [13], які є перспективними по виявленні закономірностей і можуть бути використані при конструюванні електрохімічних ферментних сенсорів для підвищення їх ефективності.

Висновки.

1. Досліджена контактна взаємодія глюкозооксидази з наночастинками золота різного розміру та встановлена здатність таких наночастинок у певних концентраціях утворювати електроактивні комплекси з глюкозооксидазою.

2. Встановлено стимуляцію каталітичної активності глюкозооксидази у електроактивних комплексах ферменту з наночастинками золота певних концентрацій.

3. Показана ефективність досліджень електроактивних комплексів ферментів з наночастинками металів методом електрофорезу в агарозному гелі для розробки сенсорних елементів електрохімічних біосенсорів.

Перспективи подальших досліджень.

Проведені дослідження відкривають перспективу конструювання і створення лабораторних прототипів електрохімічних ферментних сенсорів з використанням наночастинок золота.

References / Література

- Saha K, Agasti SS, Kim C, Li X, Rotello VM. Gold nanoparticles in chemical and biological sensing. Chem Rev. 2012;112(5):2739-2779. DOI: [10.1021/cr2001178](https://doi.org/10.1021/cr2001178).
- Pingarrón JM, Yáñez-Sedeño P, González-Cortés A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. Electrochim Acta. 2008;53(19):5848-5866. DOI: [10.1016/j.electacta.2008.03.005](https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.03.005).
- Gagner JE, Lopez MD, Dordick JS, Siegel RW. Effect of gold nanoparticle morphology on adsorbed protein structure and function. Biomaterials. 2011;32(29):7241-7252. DOI: [10.1016/j.biomaterials.2011.05.091](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.05.091).
- Bergman J, Wang Y, Wigström J, Cans AS. Counting the number of enzymes immobilized onto a nanoparticle-coated electrode. Anal Bioanal Chem. 2018;410(6):1775-1783. DOI: [10.1007/s00216-017-0829-1](https://doi.org/10.1007/s00216-017-0829-1).
- Asuri P, Karajanagi SS, Vertegel AA, Dordick JS, Kane RS. Enhanced stability of enzymes adsorbed onto nanoparticles. J Nanosci Nanotechnol. 2007;7(4-1):1675-1678. DOI: [10.1166/jnn.2007.453](https://doi.org/10.1166/jnn.2007.453).
- Skoglund S, Hedberg J, Yunda E, Godymchuk A, Blomberg E, Odnevall Wallinder I. Difficulties and flaws in performing accurate determinations of zeta potentials of metal nanoparticles in complex solutions-Four case studies. PLoS One. 2017;12(7):e0181735. DOI: [10.1371/journal.pone.0181735](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181735).
- Greaser ML, Warren CM. Protein electrophoresis in agarose gels for separating high molecular weight proteins. Methods Mol. Biol. 2012;869:111-118. DOI: [10.1007/978-1-61779-821-4_10](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_10).
- Bylay VY, redaktor. Metody eksperymental'noy mykologiyi. Kyiv: Naukova dumka; 1982. 552 s.
- Witkowska Nery E, Kundys M, Jeleń PS, Jönsson-Niedziółka M. Electrochemical Glucose Sensing: Is There Still Room for Improvement? Anal Chem. 2016;88(23):11271-11282. DOI: [10.1021/acs.analchem.6b03151](https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b03151).
- Bankar SB, Bule MV, Singhal RS, Ananthanarayan L. Glucose oxidase--an overview. Biotechnol Adv. 2009;27(4):489-501. DOI: [10.1016/j.biotechadv.2009.04.003](https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.04.003).
- Santos-Santos IJ, Zamora-Justo JA, Vázquez-Martínez GR, Cabrera-Sierra R, Balderas-López JA. Synthesis of gold nanoparticles coated with glucose oxidase using PVP as passive adsorption linkage. Front. Nanotechnol. 2024;6:1419239. DOI: [10.3389/fnano.2024.1419239](https://doi.org/10.3389/fnano.2024.1419239).
- Murata K, Suzuki M, Kajiya K, Nakamura N, Ohno H. High performance bioanode based on direct electron transfer of fructose dehydrogenase at gold nanoparticle-modified electrodes. Electrochem Commun. 2009;11(3):668-671. DOI: [10.1016/j.elecom.2009.01.011](https://doi.org/10.1016/j.elecom.2009.01.011).
- Abbasi M, Amiri R, Bordbar A-K, Ranjbakhsh E, Khosropour A-R. Improvement of the stability and activity of immobilized glucose oxidase on modified iron oxide magnetic nanoparticles, Applied Surface Science. 2016;364:752-757. DOI: [10.1016/j.apsusc.2015.12.120](https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2015.12.120).

ЕЛЕКТРОАКТИВНІ КОМПЛЕКСИ ГЛЮКОЗООКСИДАЗИ З НАНОЧАСТИНКАМИ ЗОЛОТА ДЛЯ РОЗРОБКИ ФЕРМЕНТНИХ СЕНСОРНИХ ЕЛЕМЕНТІВ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ БІОСЕНСОРІВ

Дибкова С. М., Резніченко Л. С., Грузіна Т. Г.

Резюме. Наночастинки золота можуть виступати каталізаторами різноманітних електрохімічних процесів, що обумовлює їх застосування при конструюванні електрохімічних біосенсорів. При створенні ферментних біосенсорів наночастинки золота можуть підвищувати чутливість сенсорних пристроїв. Дослідження можливості формування електроактивних комплексів наночастинок з ферментами є важливим при конструюванні електрохімічних сенсорів. Метою роботи було вивчення взаємодії ферменту глюкозооксидази з наночастинками золота при формуванні їх електроактивних комплексів. У роботі застосовували спектроскопічні, електронно-мікроскопічні, електрофоретичні та біохімічні методи. Показано, що наночастинки золота утворюють електроактивні комплекси з глюкозооксидазою, при цьому характер взаємодії та можливість утворення комп-

лексу шляхом зв'язування наночастинок з ферментом виражено залежить від розміру частинок. Досліджено контактну взаємодію глюкозооксидази з наночастинками золота різного розміру та встановлено здатність таких наночастинок у певних концентраціях утворювати електроактивні комплекси з глюкозооксидазою. Встановлено стимуляцію каталітичної активності глюкозооксидази у електроактивних комплексах ферменту з наночастинками золота певних концентрацій. Показана ефективність досліджень електроактивних комплексів ферментів з наночастинками золота методом електрофорезу в агарозному гелі для розробки сенсорних елементів електрохімічних біосенсорів.

Ключові слова: ферментні біосенсори, глюкозооксидаза, наночастинки золота, електроактивні комплекси, електрофорез.

ELECTROACTIVE COMPLEXES OF GLUCOSE OXIDASE WITH GOLD NANOPARTICLES FOR THE DEVELOPMENT OF ENZYMATIC SENSOR ELEMENTS OF ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS

Dybko S. M., Rieznichenko L. S., Gruzina T. G.

Abstract. Gold nanoparticles can act as catalysts for various electrochemical processes. It determines their use in the creation of electrochemical biosensors. When creating enzyme biosensors, gold nanoparticles can increase the sensitivity of sensor devices. The study of the possibility of forming electroactive complexes of nanoparticles with enzymes is important in the design of electrochemical sensors. The purpose of this work was to study the interaction of the glucose oxidase enzyme with gold nanoparticles by studying the formation of their electroactive complexes. Spectroscopic, electron microscopic, electrophoretic and biochemical methods were used in the work. It was shown that gold nanoparticles form electroactive complexes with glucose oxidase, and the nature of the interaction and the possibility of complex formation by binding nanoparticles to the enzyme strongly depend on the size of the particles. The interaction of glucose oxidase with gold nanoparticles of different sizes was studied and the ability of such nanoparticles to form electroactive complexes with glucose oxidase at certain concentrations was established. Stimulation of the catalytic activity of glucose oxidase in electroactive complexes of the enzyme with gold nanoparticles of certain concentrations was revealed. The efficiency of studies of electroactive complexes of enzymes with gold nanoparticles by the method of electrophoresis in agarose gel for the development of sensor elements of electrochemical biosensors is shown.

Key words: enzyme biosensors, glucose oxidase, gold nanoparticles, electroactive complexes, electrophoresis.

ORCID and contributionship: / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Dybko S. M.: <https://orcid.org/0000-0002-8580-2584> ^{ABCDEF}

Rieznichenko L. S.: <https://orcid.org/0000-0002-3652-4426> ^{ABCDEF}

Gruzina T. G.: <https://orcid.org/0000-0002-7613-7391> ^{ABCDEF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors report that there is no conflict of interest. / Автори повідомляють, що конфлікт інтересів відсутній.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Dybko Svitlana Mykolaivna / Дибкова Світлана Миколаївна

F.D. Ovcharenko Institute of Biocolloidal Chemistry, NAS of Ukraine / Інститут біоколоїдної хімії імені Ф. Д. Овчаренка НАН України

Ukraine, 03142, Kyiv, 42 Acad. Vernadskogo Ave. / Адреса: Україна, 03142, м. Київ, бульв. Академіка Вернадського 42

Tel.: +380672641530, +380509772633 / Тел.: +380672641530, +380509772633

E-mail: sdybko@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 24.03.2024 / Стаття надійшла 24.03.2024 року
Accepted 19.08.2024 / Стаття прийнята до друку 19.08.2024 року