



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 316–327

Izvestiya of Saratov University. Physics, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 316–327

<https://fizika.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1817-3020-2023-23-4-316-327>, EDN: JMIHFG

Научная статья
УДК 620.3



Особенности фотостимулированной адсорбции ферментов на полупроводниковую подложку

А. В. Козловский, С. В. Стецюра[✉]

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

Козловский Александр Валерьевич, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры материаловедения, технологии и управления качеством, kozlovsky@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3612-9776>

Стецюра Светлана Викторовна, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры материаловедения, технологии и управления качеством, stetsyurasv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4337-012X>

Аннотация. Особенности фотостимулированной адсорбции ферментов на полупроводниковую подложку, приводящие к различному изменению чувствительности к глюкозе и перекиси водорода, были изучены на примере ферментов глюкозооксидазы и пероксидазы хрена. Анализ результатов адсорбции ферментов проводился с учетом фотоэлектронных процессов в полупроводниковых подложках *n*-Si и *p*-Si. Увеличение чувствительности к аналиту от применения фотостимулированной адсорбции обнаружено для структур, полученных на основе *n*-Si независимо от вида иммобилизованного фермента. Показано, что для молекул глюкозооксидазы эффект фотостимуляции достигает 200%, а для молекул пероксидазы хрена не превышает 30%. Эффект от применения фотостимулированной адсорбции объяснен перезарядкой поверхностных электронных состояний на границе Si/SiO₂ при освещении и формированием наведенных диполей, объединяющих заряд молекулы фермента и противоположный заряд границы раздела в Si/SiO₂ после выключения освещения. Проведенные исследования могут быть применены при разработке емкостного биосенсора, работающего на полевом эффекте, поскольку учет изменения зарядового состояния иммобилизуемого фермента и поверхности полупроводникового преобразователя сигнала позволяет в ряде случаев существенно повысить чувствительность биосенсора.

Ключевые слова: кремний, полиэлектронит, ферменты, фотостимулированная адсорбция

Благодарности: Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 22-22-00194, <https://rscf.ru/project/22-22-00194/>).

Для цитирования: Козловский А. В., Стецюра С. В. Особенности фотостимулированной адсорбции ферментов на полупроводниковую подложку // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2023. Т. 23, вып. 4. С. 316–327. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2023-23-4-316-327>, EDN: JMIHFG

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Features of photo-stimulated adsorption of enzymes on semiconductor substrate

A. V. Kozlowski, S. V. Stetsyura[✉]

Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, Russia

Alexander V. Kozlowski, kozlovsky@bkru, <https://orcid.org/0000-0002-3612-9776>

Svetlana V. Stetsyura, stetsyurasv@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4337-012X>

Abstract. Background and Objectives: Features of photostimulated adsorption of enzymes on a semiconductor substrate, leading to different changes in the sensitivity to glucose and hydrogen peroxide, were studied using the enzymes glucose oxidase and horseradish peroxidase as an example. **Materials and Methods:** Enzyme molecules were deposited on *n*-Si and *p*-Si substrates by photostimulated layer-by-layer adsorption from solution. Glucose oxidase and horseradish peroxidase were used as enzymes. The resulting structures were mounted in an electrochemical cell to measure the capacitance-voltage characteristics of the electrolyte-insulator-semiconductor contact, which were then used to determine the sensitivity of the sensor structures to glucose and hydrogen peroxide. **Results:** The results were analyzed taking into account photoelectronic processes in *n*-Si and *p*-Si semiconductor substrates. An increase in the sensitivity to the analyte from the use of photostimulated adsorption has been found for the structures obtained on the basis of *n*-Si, regardless of the type of immobilized enzyme. But for glucose oxidase molecules, the effect of photostimulation reaches 200%, and for horseradish peroxidase molecules it does not exceed 30%. The effect of photostimulated adsorption is explained by the charge exchange of surface electronic states at the Si/SiO₂ interface upon illumination and the formation of induced dipoles that combine the charge of the enzyme molecule and the opposite charge of the Si/SiO₂ interface after the illumination is turned off. **Conclusion:** The conducted studies can be applied in the development of a capacitive biosensor operating on the field effect, since taking



into account the change in the charge state of the immobilized enzyme and the surface of the semiconductor signal converter makes it possible in some cases to significantly increase the sensitivity of the biosensor.

Keywords: silicon, polyelectrolyte, photo-stimulated adsorption

Acknowledgments: The work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 22-22-00194, <https://rscf.ru/en/project/22-22-00194/>).

For citation: Kozlowski A. V., Stetsyura S. V. Features of photo-stimulated adsorption of enzymes on semiconductor substrate. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2023, vol. 23, iss. 4, pp. 316–327 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2023-23-4-316-327>, EDN: JMIHFG

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC0-BY 4.0)

Введение

Ранее нами были успешно осуществлены серии экспериментов по фотостимулированному осаждению на фоточувствительную полупроводниковую подложку молекул высокомолекулярных полиэлектролитов из их водных растворов [1, 2]. Было установлено влияние типа проводимости полупроводниковой подложки [3] на эффективность и результативность фотостимуляции процесса адсорбции полиэлектролитных молекул. Были получены достаточно нетривиальные результаты, показывающие влияние облучения подложки светом с длинами волн из области чувствительности полупроводника во время адсорбции на неё полиэлектролита на толщину и плотность получаемого покрытия [1, 4]. С использованием теоретических выкладок авторов статей [5, 6] была построена модель изменения электростатического взаимодействия полиэлектролитных молекул с заряженной поверхностью фоточувствительной подложки, эффективный заряд которой изменялся под действием облучения. Было показано, что частично изменение свойств полиэлектролитного адсорбированного покрытия обусловлено изменением конформации полиэлектролитных молекул при осаждении на полупроводниковую подложку, поверхностный потенциал которой изменяется при освещении [1].

Поскольку конструкции «полупроводниковая подложка – органическое покрытие» являются основой для создания биодатчиков, работающих на полевом эффекте, то следующим логичным шагом научного исследования была адаптация разработанного технологического алгоритма фотостимулированной адсорбции (ФСА) полиэлектролитных молекул для осаждения ферментов. При проведении исследований с ферментом глюкозооксидаза были подтверждены основные закономерности ФСА полиэлектролитов на полупроводниковую подложку [7, 8]. Очевидно, что при адсорбции на твердую подложку изменение конформации молекулы фермента и способ её закрепления может привести как

к положительному эффекту, ведущему к повышению чувствительности биодатчика, так и к отрицательному эффекту из-за уменьшения биокаталитической активности фермента. Это связано с особенностями строения молекул фермента и распределением отрицательного и положительного заряда по объему молекулы в зависимости от типа функциональных групп. Ввиду большого разнообразия в строении молекул ферментов становится очевидно, что предпосылками для создания теоретического прогнозирования результатов ФСА ферментов на полупроводниковую подложку может быть только установление эмпирических закономерностей, определяющих процессы самоорганизации молекул различных типов ферментов в процессе их иммобилизации на подложку, а также исследование в процессе ФСА адаптивных изменений поверхностного потенциала молекул фермента. Для сравнения воздействия освещения на результаты адсорбции и каталитическую чувствительность биодатчиков были выбраны два типа молекул ферментов – глюкозооксидаза и пероксидаза хрена, имеющие широкие сферы применения, в том числе и в биосенсорике [9, 10]. Глюкозооксидаза используется для идентификации и количественного анализа свободной глюкозы, а пероксидаза хрена является окислительно-восстановительным ферментом, используемым при разработке биосенсоров для определения H_2O_2 .

Таким образом, целью данного исследования стал сравнительный анализ эффективности и результативности ФСА молекул ферментов глюкозооксидазы и пероксидазы хрена на чувствительность структур «полупроводник – ферментное покрытие» к глюкозе и перекиси водорода соответственно.

1. Материалы и методы

1.1. Характеристики ферментов

Для анализа особенностей результатов ФСА ферментов необходимо хорошо представлять различия в строении и заряде выбранных для исследования ферментов. При выборе в первую



очередь обращалось внимание на доступность и широкое применение ферментов для практических и научных целей [11, 12], а также на то, чтобы анализируемые ферменты имели различные по знаку эффективные заряды в рабочем диапазоне pH и существенно различались нативной конформацией молекул и геометрическими параметрами.

Глюкозооксидаза. Фермент глюкозооксидаза (GOx) широко применяется в пищевой и медицинской отраслях, с использованием глюкозооксидазы создается огромное количество разнообразных по конструкции биосенсоров. Кроме того, поскольку глюкозооксидаза достаточно хорошо изучена, то при разработке новых конструкций ферментных биосенсоров или новых способов иммобилизации ферментов глюкозооксидазу часто используют в исследовательских целях в качестве модельного объекта [10, 12].

Глюкозооксидаза – это димер, молекула которого имеет эллиптическую форму, состоит из двух одинаковых субъединиц с молекулярной массой 80 кДа. В наших экспериментах использовалась глюкозооксидаза из *Aspergillus niger* (Sigma Aldrich) с молекулярной массой 160 кДа (рис. 1, а, б). Размеры такой молекулы в нативном состоянии, по данным работ [13, 14], составляют 6.0 нм × 5.2 нм × 7.7 нм. В водном растворе молекулы GOx имеют эффективный отрицательный заряд и являются анионами – изоэлектрическая точка находится при pH = 4.2, что подтвержде-

но многими авторами и нашими исследованиями дзета-потенциала [15].

В соответствии с [14] большая часть поверхности GOx имеет отрицательный потенциал, однако распределение заряда по её поверхности неоднородно, и существуют положительные потенциальные области (участки с номерами 1–6 на рис. 1, б), состоящие из положительно заряженных остатков. Предполагается, что, благодаря наличию положительных потенциальных областей и их сосредоточению на одной стороне молекулы GOx, уменьшается электростатическое отталкивание между отрицательно заряженной полупроводниковой поверхностью и молекулами фермента, в целом имеющим преобладание отрицательного заряда. Тем самым обеспечивается благоприятная с точки зрения биокатализа адсорбция молекул GOx положительно заряженной стороной на отрицательно заряженную поверхность полупроводника [14].

Пероксидаза хрена. Пероксидаза хрена (англ. Horse radish peroxidase – HRP), как было указано выше, используется при разработке биосенсоров для определения H_2O_2 , а также органических пероксидов, молекул алкоголя и для определения некоторых биомолекул, таких как различные виды аминокислот и глюкозы. Идентификация указанных молекул происходит путем совместной иммобилизации молекул соответствующей оксидазы и HRP на поверхности электрода [17]. Накопленные данные позволили эффективно использовать этот фермент при со-

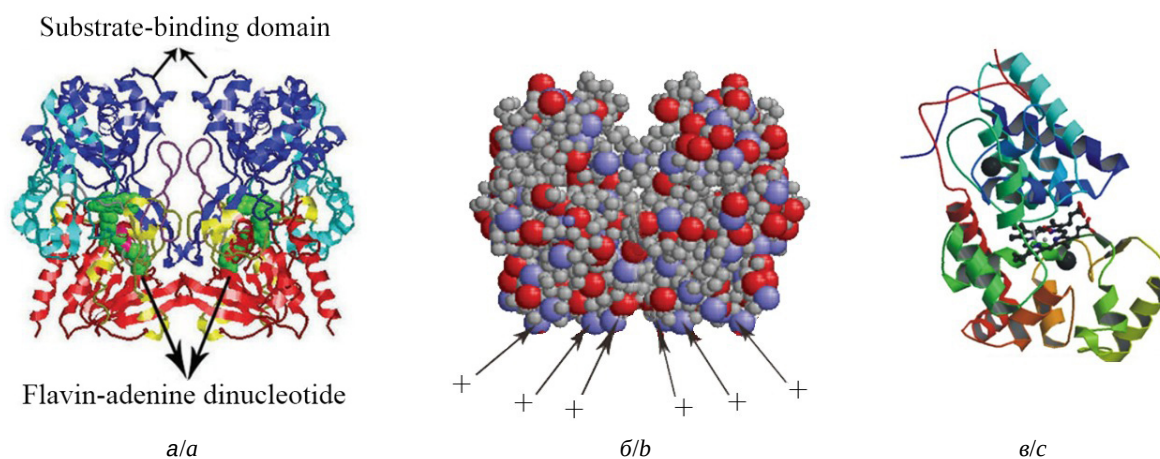


Рис. 1. Структура молекулы GOx (а), распределение положительно заряженных участков (+) на поверхности молекулы глюкозооксидазы (б) [14], структура молекулы пероксидазы хрена (в) – разные цвета обозначают различные изоферменты молекулы пероксидазы хрена [16] (цвет онлайн)

Fig. 1. Structure of the GOx molecule (a), distribution of positively charged sections (+) on the GOx surface (b) [14], structure of the horseradish peroxidase molecule (c) – different colors denote different isoenzymes of the horseradish peroxidase molecule [16] (color online)



здании иммунологических тестов, биосенсоров, маркеров для гистологических исследований, в генной терапии и органическом синтезе [16, 18, 19].

Наш выбор этого фермента основан на существенных отличиях его характеристик от GOx, среди которых можно выделить относительно малые размеры молекул и повышенную амфотерность. Так, молекулярная масса HRP составляет 44 кДа, из которой 20% уходит на углеводородную часть (рис. 1, в). Геометрические размеры составляют 3.6 нм × 6.2 нм × 4.2 нм, гидродинамический радиус не превышает 8 нм [16].

Необходимо отметить, что амфотерность молекул HRP привела к тому, что существующие данные об электрохимических свойствах этого фермента разнятся. Так, из статьи [16] следует, что молекулы HRP имеют положительный дзета-потенциал в водных растворах с низкой ионной силой при $\text{pH} \leq 4$, который быстро падает, пересекает 0 мВ между pH 4.2 и 4.5 и становится отрицательным при $\text{pH} \geq 5$. Авторы [20] провели достаточно масштабное исследование, в результате которого сделали вывод, что поверхностные заряды молекул HRP и электрода играют доминирующую роль в иммобилизации и в эффективности каталитических процессов с участием этого фермента. При этом они отмечают, что нативная форма HRP считается катионной с изоэлектрической точкой при $\text{pH} = 8.8$ [20]. Авторы [21] подчеркивают, что при изучении электрохимических и электрофизических характеристик фермента HRP необходимо учитывать, что это сложная молекула, состоящая из различных структурных элементов. В статье говорится, что молекула HRP состоит более чем из двадцати изоферментов с изоэлектрическими точками в диапазоне от 3.5 до 9 pH , причем изоферменты, в наибольшей мере отвечающие за каталитическую активность, обладают изоэлектрическими точками в диапазоне pH от 5.5 до 7.6. То есть при изменении pH изоферменты не одновременно изменяют знак заряда, и при разных pH вследствие этого обстоятельства электрохимические, электрофизические и сенсорные характеристики фермента HRP могут различаться. В результате экспериментов по химической модификации HRP авторы статьи [21] сделали вывод, что для немодифицированной молекулы HRP изоэлектрическая точка находится в диапазоне от 7.35 до 7.55 pH .

Знак заряда и его распределение по поверхности молекулы фермента имеют важное

значение в наших исследованиях, поскольку определяют не только эффективность ФСА, но и каталитическую активность иммобилизованного фермента, влияющую на чувствительность биосенсора.

1.2. Протокол получения гибридных ферментных структур на основе кремния

Для проведения экспериментов по ФСА ферментов и определению влияния этого метода на сенсорные характеристики ферментных биодатчиков были созданы гибридные структуры на основе монокристаллического кремния. Пластины Si (Silchem Handelsgesellschaft mbH, Германия) *n*- и *p*-типа использовались в качестве полупроводникового преобразователя сигнала. Перед нанесением фермента пластины Si обрабатывались в перекисно-аммиачном растворе в течение 10 мин при температуре 75°C, что приводило к частичному стравливанию и доокислению слоя естественного окисла до SiO_2 , при этом на поверхности SiO_2 происходит активация отрицательно заряженных в воде при $\text{pH} > 3$ OH^- групп [22]. Толщина слоя SiO_2 на подготовленных кремниевых пластинах была оценена с помощью эллипсометрии и составила $19 \pm 1 \text{ \AA}$.

Адсорбция молекул GOx проводилась из водного раствора с концентрацией 0.1 мг/мл в течение 10 мин. Затем образцы промывались в деионизированной воде и сушились в потоке сухого воздуха для удаления незакрепленных молекул. Адсорбция молекул HRP проводилась так же, но из водного раствора концентрацией 0.5 мг/мл ввиду их плохой визуализации на подложке при меньших концентрациях.

Во время адсорбции молекул ферментов часть образцов освещалась светом из области поглощения Si. С этой целью использовался волоконный осветитель с галогенной лампой. Освещённость в центре светового пятна была примерно 20000 лк.

1.3. Методы и режимы исследования

Качество обработки подложек, однородность нанесения фермента контролировались с помощью зондовой нанолaborатории «NTEGRA-Spectra» (NT-MDT Spectrum Instruments, Россия). С этой целью отслеживалась морфология поверхности исследуемых образцов методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) и контактная разность потенциалов между зондом и поверхностью методом сканирующей зондовой микроскопии Кельвина



(СЗМК). Сканирование осуществлялось с помощью кантилеверов HA_NC/W₂C с проводящим слоем W₂C. Радиус кривизны этих зондов менее 35 нм, что обеспечивает высокую точность сканирования. Для анализа данных использовалось программное обеспечение Gwyddion 2.63.

Измерение вольт-фарадных характеристик (ВФХ) проводилось при помощи анализатора полупроводниковых приборов Agilent B1500a (Agilent Technologies, США) Измерения проводились по методике, частично представленной в [23] и адаптированной нами для учета знака заряда молекул HRP и GOx, адсорбируемых из водного раствора с pH = 7.05 на кремниевые подложки. Измерение ВФХ проходило на этапе исследования сенсорных свойств на частотах переменного напряжения 1–10 кГц с амплитудой 20 мВ в диапазоне постоянных смещений ±1 В.

Исследование сенсорных свойств гибридных структур «Si/SiO₂/слой фермента GOx или HRP» проводилось в электрохимической ячейке (рис. 2), позволяющей измерять ВФХ в растворе аналита (соответственно, глюкозы или перекиси водорода). Для определения влияния освещения на чувствительность структуры Si/SiO₂/GOx были подготовлены растворы с pH=7.05 (концентрация буфера 0.2 мМ) и различными концентрациями глюкозы: 1, 5 и 10 мМ. Аналогично для структуры Si/SiO₂/HRP были подготовлены растворы с pH = 7.05 и концентрациями перекиси водорода от 1 до 10 мМ. Во время измерений поддерживалась температура 22 ± 1°C.

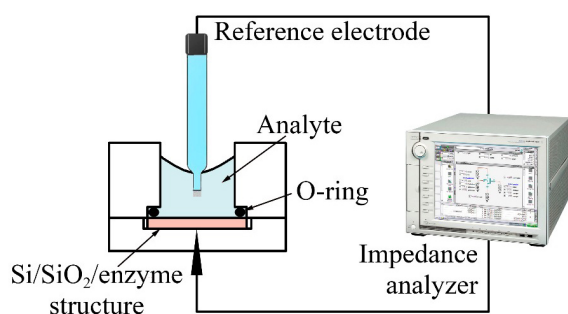


Рис. 2. Схематичное изображение электрохимической ячейки (цвет онлайн)

Fig. 2. Schematic representation of an electrochemical cell (color online)

Лицевая поверхность кремниевой структуры была герметизирована уплотнительным кольцом и контактировала с электролитом, в который погружался Ag/AgCl-электрод сравнения. На тыльную сторону кремниевой пластины предварительно напыляли металлический контакт,

который был изолирован от раствора и контактировал только с позолоченным штекером электрохимической ячейки.

Предварительно проводилась градуировка структуры Si/SiO₂, для чего она погружалась в ацетатный или калий-фосфатный буферный раствор концентрации 0.1 М и разными значениями pH. Диапазон pH составил 3.8–7.5. Также для увеличения ионной силы раствора добавляли NaCl в концентрации 0.15 М. ВФХ измерялись при разных значениях pH, причем после каждого измерения область затвора датчика промывали деионизированной водой.

Чувствительность к глюкозе и перекиси водорода полученных сенсорных структур изучали также с помощью измерений ВФХ по изменению значений потенциала плоских зон и сдвигу ВФХ вдоль оси напряжений. Для этого в ячейку помещали соответствующий раствор аналита и измеряли ВФХ системы электролит – образец. После каждого измерения область затвора датчика промывали буферным раствором.

Протекание ферментативной реакции приводит к изменению pH раствора, по которому можно судить о концентрации аналита в растворе. Поскольку изменение pH – это изменение концентрации катионов водорода в растворе, в первую очередь вблизи поверхности сенсорной структуры, то происходит сдвиг ВФХ из-за изменения потенциала поверхности. Уменьшение значений ёмкости на участке обогащения ВФХ, сопровождающее сдвиг ВФХ, обусловлено дополнительной последовательно включенной емкостью слоя молекул фермента. Таким образом, параметры ферментного слоя (толщина, плотность, проводимость), меняющиеся при ФСА, будут изменять вид ВФХ исследуемой структуры, помещенной в раствор электролита, что, в свою очередь, отразится на чувствительности биосенсора к аналиту [24, 25].

2. Результаты измерений и их обсуждение

2.1. Исследование влияния освещения и типа проводимости подложки на адсорбцию глюкозооксидазы

Результаты измерений поверхности структур Si/SiO₂/ПЭИ/GOx в режиме атомно-силовой микроскопии (АСМ) показаны на рис. 3.

С учетом известных параметров молекулы GOx и ограничений метода измерения [26, 27] из анализа АСМ-изображений на рис. 3 были получены значения поверхностной плотности адсорбированных молекул GOx и их изменение

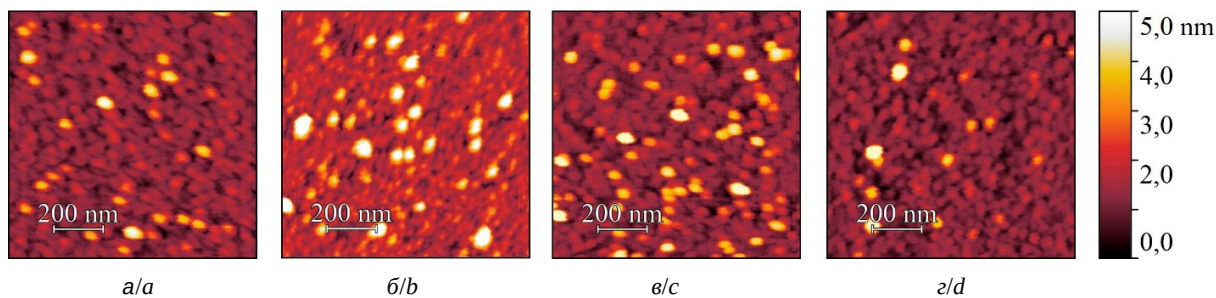


Рис. 3. АСМ-изображения поверхности *n*-Si (а, б) и *p*-Si (в, г) после нанесения GOx в темноте (а, в) и при освещении (б, г) (цвет онлайн)

Fig. 3. AFM images of *n*-Si (a, b) and *p*-Si (c, d) surfaces after GOx deposition in the dark (a, c) and under illumination (b, d) (color online)

от освещенности во время адсорбции. Результаты анализа представлены на рис. 4, а, из которого следует, что влияние освещения на адсорбцию GOx более высокое при использовании в качестве подложки *n*-Si, причем в этом случае прирост числа адсорбированных молекул фермента положительный, а в случае *p*-Si – отрицательный.

Изменение поверхностного потенциала $\Delta\phi$ пропорционально числу адсорбированных молекул GOx, заряженных в растворе отрицательно. Как следует из рис. 4, б, освещение кремниевой структуры в процессе нанесения GOx приводит к изменению $\Delta\phi$ относительно «темнового» режима, причем характер изменения потенциала зависит от типа проводимости Si. Из рис. 4, б следует, что с увеличением освещенности в случае использования пластины *p*-Si $\Delta\phi$ уменьшается по сравнению с «темновым режимом» адсорбции

в 2–2.5 раза, а в случае *n*-Si происходит увеличение $\Delta\phi$ в 10–12 раз, что, в свою очередь, означает уменьшение и увеличение поверхностной плотности GOx при освещении кремниевой подложки в процессе адсорбции. Эти данные коррелируют с анализом АСМ-изображений, показанными на рис. 3.

Объяснить эти результаты возможно, учитывая влияние освещения и адсорбции заряженных молекул фермента на параметры области пространственного заряда (ОПЗ) и перезарядку поверхностных электронных состояний (ПЭС) на границе Si/SiO₂. До облучения и адсорбции заряд ОПЗ равен по модулю и противоположен по знаку заряду ПЭС. Знак заряда ПЭС на границе раздела соответствует знаку основных носителей заряда в полупроводнике. Электростатическое отталкивание будет препятствовать

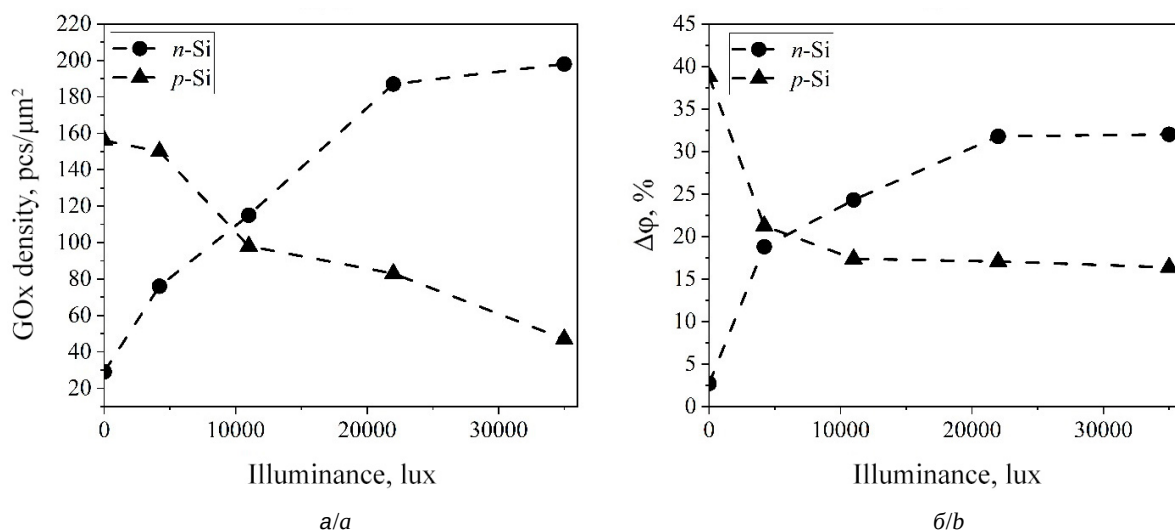


Рис. 4. Изменение поверхностной плотности молекул GOx (а) и поверхностного потенциала (б) при разных освещенностях подложки в процессе нанесения GOx

Fig. 4. Changes in the surface density of GOx molecules (a) and the surface potential (b) at different substrate illumination levels during GOx deposition



молекулам анионного полиэлектролита GOx адсорбироваться на поверхности *n*-Si в темноте. При освещении светом из области поглощения Si заряд поверхностных электронных состояний на границе раздела Si/SiO₂ уменьшается и может стать равным нулю. Адсорбированные к этому моменту анионы GOx могут привести к перезарядке ПЭС до положительных значений за счет дрейфа электронов в глубь полупроводника в поле анионов GOx.

В случае *p*-Si электростатическое взаимодействие уже при «темновой» адсорбции способствует прикреплению молекул GOx на поверхности полупроводниковой подложки. Освещение в этом случае приводит к уменьшению эффективного положительного заряда структуры *p*-Si/SiO₂, что уменьшает количество адсорбированных полианионных молекул GOx по сравнению с темновым нанесением. Причем использование в качестве подложки *p*-Si приводит

к меньшему относительному изменению плотности иммобилизованных молекул GOx, чем в случае *n*-Si, но абсолютная разница иммобилизованных молекул GOx при высоких уровнях освещенности примерно выравнивается.

2.2. Исследование влияния освещения и типа проводимости подложки на адсорбцию пероксидазы хрена

Результаты измерений поверхности структур Si/SiO₂/HRP в режиме АСМ показаны на рис. 5.

По величине изменения средней высоты неровностей на сканах, представленных на рис. 5, и шероховатости можно судить об успешности иммобилизации молекул HRP (рис. 6, а). Нанесение органических молекул приводит к увеличению средней высоты неровностей (*H*). Изменение шероховатости зависит как от количества адсорбированных частиц, так и от однородности (равномерности) поверхностного слоя. Из анали-

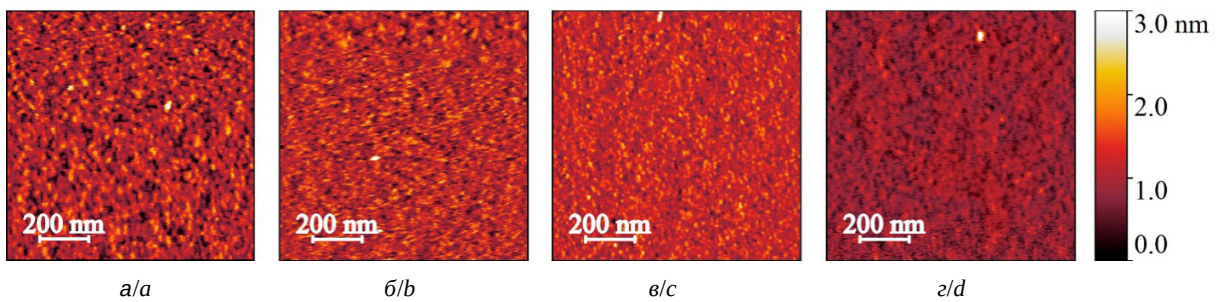


Рис. 5. АСМ-изображения поверхности *n*-Si (а, б) и *p*-Si (в, г) после нанесения HRP в темноте (а, в) и при освещении (б, г) (цвет онлайн)

Fig. 5. AFM images of *n*-Si (a, b) and *p*-Si (c, d) surfaces after HRP deposition in the dark (a, c) and under illumination (b, d) (color online)

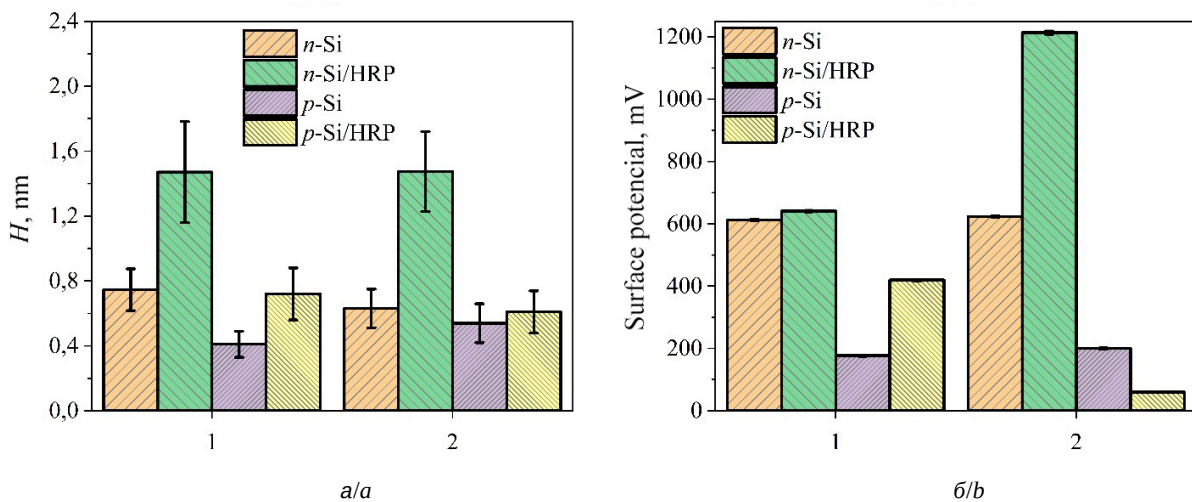


Рис. 6. Средняя высота неровностей (а) и поверхностный потенциал (б), наблюдаемые после темного (1) и светового (2) нанесения HRP на подложки *n*-Si и *p*-Si из водного раствора (цвет онлайн)

Fig. 6. Average irregularity height (a) and surface potential (b) observed after deposition of HRP on *n*-Si and *p*-Si substrates from an aqueous solution in the dark (1) and under illumination (2) (color online)



за изображений на рис. 5 и диаграммы на рис. 6, а следует, что эффективна ФСА была только в случае использования структуры на основе *n*-Si

По распределению поверхностного потенциала (рис. 6, б) можно сказать, что нанесение молекул фермента HRP на поверхность Si приводит к увеличению поверхностного потенциала в случае темнового нанесения фермента. При этом ФСА HRP в зависимости от проводимости подложки (электронной или дырочной) приводит к противоположным изменениям поверхностного потенциала: для случая Si с электронной проводимостью потенциал поверхности после нанесения HRP увеличивается, а для случая Si с дырочной проводимостью – уменьшается. Этот результат был неоднократно воспроизведен и это позволяет утверждать, что эффективный заряд молекул HRP в растворе очень чувствителен к из-

менениям pH вблизи освещаемой поверхности полупроводниковой подложки. Кроме того, сопоставимое количество структурных элементов молекулы HRP, имеющих противоположный заряд, приводит к тому, что нейтрализуется либо положительный, либо отрицательный заряд молекул HRP в зависимости от эффективного заряда поверхности кремниевой структуры.

2.3. Исследование сенсорных свойств

На рис. 7 показаны типичные ВФХ сенсорных структур, на которые молекулы ферментов наносили в темноте и при освещении подложек *p*-Si (рис. 7, а, в) и *n*-Si (рис. 7, б, г). С ростом концентрации глюкозы в растворе кривые ВФХ смещаются вдоль оси напряжений в направлении отрицательных значений вне зависимости от типа проводимости Si. Это связано с ростом

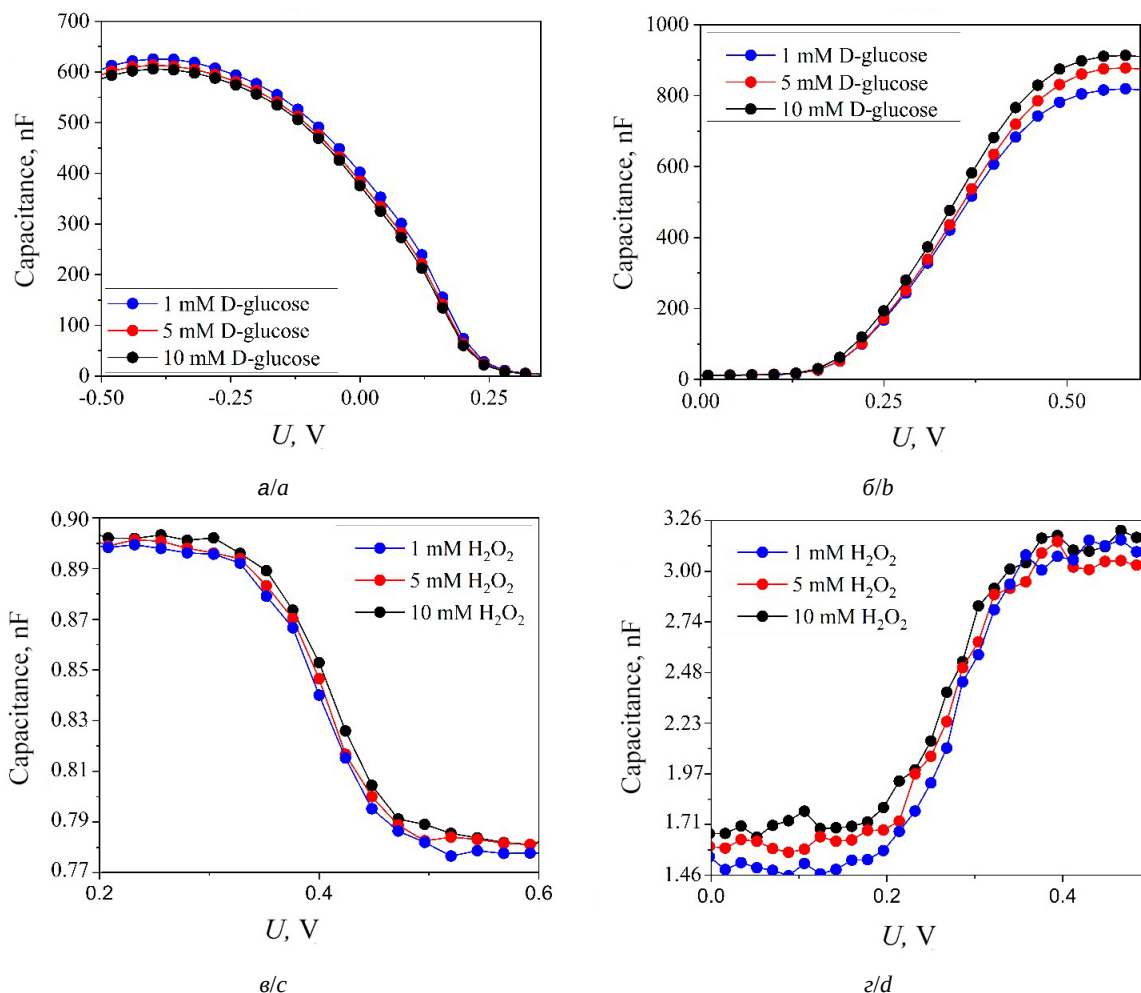


Рис. 7. Типичные ВФХ сенсорных структур на основе *p*-Si (а, в) и *n*-Si (б, г), измеренные в растворах аналита (глюкозы (а, б) или перекиси водорода (в, г)) с различными концентрациями от 1 до 10 мМ (цвет онлайн)

Fig. 7. Typical C-V characteristics of sensor structures based on *p*-Si (a, c) and *n*-Si (b, d), measured in analyte solutions (glucose (a, b) or hydrogen peroxide (c, d)) at various concentrations from 1 to 10 mM (color online)



концентрации катионов H^+ в растворе вблизи поверхности сенсорной структуры вследствие ферментативной реакции окисления глюкозы.

Ионы H^+ приводят к изменению потенциала поверхности гибридной структуры, что отражается на значениях измеряемой емкости. Величина сдвига ВФХ, произошедшая вследствие ферментативной реакции, характеризует чувствительность биосенсора к аналиту.

При градуировке получено, что чувствительность к рН сенсорных структур на основе Si дырочной проводимости составляет 52.07 мВ/рН. Чувствительность к рН у подложек *n*-Si ниже, чем у *p*-Si, и не превышает значения 34.8 мВ/рН.

При погружении сенсорной структуры непосредственно в раствор глюкозы чувствительность составила 1.9 мВ/мМ для структуры на основе *n*-Si, а в случае фотостимулированной адсорбции GOx чувствительность к аналиту достигла значения 5.8 мВ/мМ. Для структуры на *p*-Si без использования ФСА в процессе её создания чувствительность к глюкозе была 2.9 мВ/мМ, а для аналогичной структуры, полученной при освещении во время адсорбции GOx, чувствительность уменьшилась до 2.2 мВ/мМ.

Эти данные хорошо согласуются с результатами анализа АСМ и СЗМК изображений (см. рис. 3, 4). Эффект ФСА объяснен перезарядкой поверхностных электронных состояний на границе Si/SiO₂ при освещении, которая различна для структур с разным типом проводимости. Захват неравновесных электронов (неосновных носителей заряда в *p*-Si) на поверхностные состояния границы раздела Si/SiO₂ при освещении приводит к увеличению эффективного отрицательного заряда на поверхности сенсорной структуры и увеличивает электростатическое отталкивание от неё анионов GOx, ухудшая тем самым условия иммобилизации фермента. Для структуры на основе *n*-Si ситуация противоположная – наблюдается увеличение количества адсорбированных молекул GOx на полупроводниковой подложке при ФСА благодаря усилению электростатического притяжения между поверхностью и адсорбируемыми молекулами. Сохранению эффекта от ФСА после выключения освещения способствует формирование наведенных диполей, объединяющих заряд GOx и противоположный заряд границы раздела Si/SiO₂.

При добавлении раствора H₂O₂ на поверхность структуры «*p*-Si-SiO₂-HRP» ВФХ сдвигается вправо по оси напряжений. Это связано с появлением активного кислорода O⁻, который

образуется в результате ферментативной реакции разложения перекиси водорода. При этом можно отметить, что для структур на основе *n*-Si ВФХ при увеличении концентрации H₂O₂ в большинстве случаев сдвигается влево, либо не меняется, что, возможно, вызвано окислением функциональных групп на поверхности *n*-Si, либо низкой концентрацией образовавшегося кислорода. Чувствительность к H₂O₂ составляет 1.3 мВ/мМ для *p*-Si и 2.9 мВ/мМ для *n*-Si, а в случае фотостимулированной адсорбции HRP – 17 мВ/мМ и 2.8 мВ/мМ соответственно. Изменения чувствительности структуры Si/SiO₂/HRP к H₂O₂ при использовании ФСА менее однозначны, чем в случае глюкозы с глюкозооксидазой, что объясняется амфотерностью молекул HRP. Тем не менее, очевидно, что увеличение плотности иммобилизованного фермента HRP при ФСА коррелирует с увеличением чувствительности к аналиту.

Заключение

Таким образом, изменение чувствительности сенсорных структур в случае фотостимуляции структуры Si/SiO₂ при осаждении ферментов происходит пропорционально изменению плотности адсорбированных ферментов, изменения каталитической активности которых при применении ФСА зафиксировано не было.

Положительный эффект от применения ФСА обнаружен только для гибридных структур, полученных на основе *n*-Si независимо от вида иммобилизованного фермента (HRP или GOx), но для имеющих выраженный анионный характер молекул GOx эффект фотостимуляции достигает 200%, а для молекул HRP, проявляющих амфотерные свойства, не превышает 30%. Выводы подтверждаются данными АСМ и СЗМК.

Эффект от применения ФСА объяснен перезарядкой поверхностных электронных состояний на границе Si/SiO₂ при освещении, которая различна для структур с разным типом проводимости Si. Положительный эффект от применения освещения во время адсорбции фермента сохраняется после выключения освещения за счет формирования наведенных диполей, объединяющих заряд молекулы фермента и противоположный заряд границы раздела Si/SiO₂.

Проведенные исследования могут быть применены при разработке емкостного биосенсора, работающего на полевом эффекте, поскольку



учет изменения зарядового состояния иммобилизуемого фермента и поверхности полупроводникового преобразователя сигнала позволяет в ряде случаев существенно повысить чувствительность биосенсора.

Список литературы

1. Malyar I. V., Gorin D. A., Santer S., Stetsyura S. V. Photocontrolled Adsorption of Polyelectrolyte Molecules on a Silicon Substrate // *Langmuir*. 2013. Vol. 29, iss. 52. P. 16058–16065. <https://doi.org/10.1021/la403838n>
2. Маляр И. В., Сантер С., Стецюра С. В. Влияние освещения на параметры полимерного покрытия, осаждаемого из раствора на полупроводниковую подложку // *Письма в ЖТФ*. 2013. Т. 39, вып. 14. С. 69–76. <https://journals.ioffe.ru/articles/viewPDF/14567>
3. Стецюра С. В., Козловский А. В., Маляр И. В. Влияние типа проводимости кремниевой подложки на эффективность метода фотостимулированной адсорбции полиэлектролитов // *Письма в ЖТФ*. 2017. Т. 43, вып. 8. С. 26–33. <https://doi.org/10.21883/PJTF.2017.08.44531.16545>
4. Козловский А. В., Стецюра С. В. Особенности формирования органического полиэлектролитного слоя на освещаемой полупроводниковой подложке // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия : Физика*. 2022. Т. 22, вып. 3. С. 254–265. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2022-22-3-254-265>
5. Dobrynin A. V., Deshkovski A., Rubinstein M. Adsorption of Polyelectrolytes at an Oppositely Charged Surface // *Phys. Rev. Lett.* 2000. Vol. 84, iss. 14. P. 3101–3104. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.84.3101>
6. Dobrynin A. V., Rubinstein M. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces // *Prog. Polym. Sci.* 2005. Vol. 30, iss. 11. P. 1049–1118. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.07.006>
7. Стецюра С. В., Козловский А. В. Влияние фотоэлектронных процессов в полупроводниковой подложке на адсорбцию поликатионных и полианионных молекул // *Письма в ЖТФ*. 2017. Т. 43, вып. 6. С. 15–22. <https://doi.org/10.21883/PJTF.2017.06.44399.16510>
8. Kozlowski A. V., Stetsyura S. V. Kinetics of photo-stimulated adsorption of enzyme molecules onto n- and p-type silicon // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2019. Vol. 699. Article number 012022 (4 p.). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/699/1/012022>
9. Григоренко В. Г., Андреева И. П., Рубцова М. Ю., Егоров А. М. Рекомбинантная пероксидаза хрена: получение и использование в аналитических целях // *Биохимия*. 2015. Т. 80, № 4. С. 480–488.
10. Portaccio M., Lepore M. Determination of Different Saccharides Concentration by Means of a Multienzymes Amperometric Biosensor // *Journal of Sensors*. 2017. Vol. 2017. Article number 7498945 (8 p.). <https://doi.org/10.1155/2017/7498945>
11. Кайгородов К. Л., Смирнова М. А., Тарабанько В. Е. Синтез диванилина в присутствии водной вытяжки и сока корня хрена // *Журн. Сиб. федер. университета. Химия*. 2020. Т. 13, № 4. С. 525–533. <https://doi.org/10.17516/1998-2836-0195>
12. Harris J. M., Reyes C., Lopez G. P. Common Causes of Glucose Oxidase Instability in Vivo Biosensing: A Brief Review // *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2013. Vol. 7, № 4. Article number 1030 (8 p.). <https://doi.org/10.1177/193229681300700428>
13. Hecht H. J., Kalisz H. M., Hendle J., Schmid R. D., Schomburg D. Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 1993. Vol. 229, iss. 1. P. 153–172. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1015>
14. Xie Y., Li Z., Zhou J. Hamiltonian replica exchange simulations of glucose oxidase adsorption on charged surfaces // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2018. Vol. 20, iss. 21. P. 14587–14596. <https://doi.org/C8CP00530C>
15. Maslennikova A. A., Kozlowski A. V., Santer S., Stetsyura S. V. The influence of illumination and ionic strength of a solution on the formation of biosensor structure based on a silicon substrate and glucose oxidase molecules // *Journal of Physics: Conference Series*. 2019. Vol. 1400. Article number 077052 (6 p.) <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1400/7/077052>
16. Tan S., Gu D., Liu H., Liu Q. Detection of a single enzyme molecule based on a solid-state nanopore sensor // *Nanotechnology*. 2016. Vol. 27. № 15. Article number 1555021 (11 p.). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/15/155502>
17. Ahirwal G. K., Mitra C. K. Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase–Gold Nanoparticles Conjugate // *Sensors*. 2009. Vol. 9, iss. 2. P. 881–894. <https://doi.org/10.3390/s90200881>
18. Nandini S., Nalini S., Manjunatha R., Shanmugam S., Melo J. S., Suresh G. S. Electrochemical biosensor for the selective determination of hydrogen peroxide based on the co-deposition of palladium, horseradish peroxidase on functionalized-graphene modified graphite electrode as composite // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2013. Vol. 689. P. 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.11.004>
19. Krainer F. W., Glieder A. An updated view on horseradish peroxidases: Recombinant production and biotechnological applications // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015. Vol. 99. P. 1611–1625. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6346-7>
20. Ferapontova E., Domínguez E. Adsorption of differently charged forms of horseradish peroxidase on metal electrodes of different nature: Effect of surface charges // *Bioelectrochemistry*. 2002. Vol. 55, iss. 1–2. P. 127–130. [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(01\)00155-4](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(01)00155-4)
21. Rennke H. G., Venkatachalam M. A. Chemical modification of horseradish peroxidase. Preparation and characterization of tracer enzymes with different isoelectric points // *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1979. Vol. 27, iss. 10. P. 1352–1353. <https://doi.org/10.1177/27.10.41873>



22. Cloarec J. P., Chevalier C., Genest J., Beauvais J., Chamas H., Chevotot Y., Baron T., Souifi A. pH driven addressing of silicon nanowires onto Si₃N₄/SiO₂ micro-patterned surfaces // *Nanotechnology*. 2016. Vol. 27. Article number 295602 (10 p.). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/29/295602>
23. Movillia J., Huskens J. Functionalized Polyelectrolytes for Bioengineered Interfaces and Biosensing Applications // *Organic Materials*. 2020. Vol. 2, iss. 2. P. 78–107. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1708494>
24. Poghossian A., Abouzar M. H., Amberger F., Mayer D., Han Y., Ingebrandt S., Offenhausser A., Schoning M. J. Field-effect sensors with charged macromolecules: Characterisation by // *Biosensors and Bioelectronics*. 2007. Vol. 22, iss. 9–10. P. 2100–2107. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.09.014>
25. Garyfallou G. Z., de Smet L. C. P. M., Sudhölter E. J. R. The effect of the Type of doping on the electrical characteristics of electrolyte–oxide–silicon sensors: pH sensing and polyelectrolyte adsorption // *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2012. Vol. 168. P. 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.04.010>
26. Aué J., de Hosson J. T. Influence of atomic force microscope tip-sample interaction on the study of scaling behavior // *Appl. Phys. Lett.* 1997. Vol. 71, iss. 10. P. 1347–1349. <https://doi.org/10.1063/1.120415>
27. Makky A., Viel P., Chen S. W., Berthelot T., Pellequer J., Polesel-Maris J. Piezoelectric tuning fork probe for atomic force microscopy imaging and specific recognition force spectroscopy of an enzyme and its ligand // *J. Mol. Recognit.* 2013. Vol. 26, iss. 11. P. 521–531. <https://doi.org/10.1002/jmr.2294>
- 2005, vol. 30, iss. 11, pp. 1049–1118. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2005.07.006>
7. Stetsyura S. V., Kozłowski A. V. The influence of photoelectron processes in a semiconductor substrate on the adsorption of polycationic and polyanionic molecules. *Technical Physics Letters*, 2017, vol. 43, iss. 3, pp. 285–288. <https://doi.org/10.1134/S1063785017030233>
8. Kozłowski A. V., Stetsyura S. V. Kinetics of photo-stimulated adsorption of enzyme molecules onto *n*- and *p*-type silicon. *IOP Conference Series : Materials Science and Engineering*, 2019, vol. 699, article no. 012022 (4 p.). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/699/1/012022>
9. Grigorenko V. G., Andreeva I. P., Rubtsova M. Yu., Egorov A. M. Recombinant horseradish peroxidase: Production and analytical applications, *Biochemistry (Moscow)*, 2015, vol. 80, no. 4, pp. 408–416. <https://doi.org/10.1134/S0006297915040033>
10. Portaccio M., Lepore M. Determination of Different Saccharides Concentration by Means of a Multienzymes Amperometric Biosensor. *Journal of Sensors*, 2017, vol. 2017, article no. 7498945 (8 p.). <https://doi.org/10.1155/2017/7498945>
11. Kaygorodov K. L., Smirnova M. A., Tarabanko V. E. Synthesis of Divanillin in the Presence of Water Extract and Juice of Horseradish Root. *Journal of Siberian Federal University. Chemistry*, 2020, vol. 13, no. 4, pp. 525–533 (in Russian). <https://doi.org/10.17516/1998-2836-0195>
12. Harris J. M., Reyes C., Lopez G. P. Common Causes of Glucose Oxidase Instability in Vivo Biosensing: A Brief Review. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2013, vol. 7, no. 4, article no. 1030 (8 p.). <https://doi.org/10.1177/193229681300700428>
13. Hecht H. J., Kalisz H. M., Hendle J., Schmid R. D., Schomburg D. Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 1993, vol. 229, iss. 1, pp. 153–172. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1015>
14. Xie Y., Li Z., Zhou J. Hamiltonian replica exchange simulations of glucose oxidase adsorption on charged surfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2018, vol. 20, iss. 21, pp. 14587–14596. <https://doi.org/10.1039/C8CP00530C>
15. Maslennikova A. A., Kozłowski A. V., Santer S., Stetsyura S. V. The influence of illumination and ionic strength of a solution on the formation of biosensor structure based on a silicon substrate and glucose oxidase molecules. *Journal of Physics: Conference Series*, 2019, vol. 1400, article no. 077052 (6 p.). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1400/7/077052>
16. Tan S., Gu D., Liu H., Liu Q. Detection of a single enzyme molecule based on a solid-state nanopore sensor. *Nanotechnology*, 2016, vol. 27, no. 15, article no. 1555021 (11 p.). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/15/155502>
17. Ahirwal G. K., Mitra C. K. Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase-Gold Nanoparticles Conjugate. *Sensors*, 2009, vol. 9, iss. 2, pp. 881–894. <https://doi.org/10.3390/s90200881>

References



18. Nandini S., Nalini S., Manjunatha R., Shanmugam S., Melo J. S., Suresh G. S. Electrochemical biosensor for the selective determination of hydrogen peroxide based on the co-deposition of palladium, horseradish peroxidase on functionalized-graphene modified graphite electrode as composite. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2013, vol. 689, pp. 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2012.11.004>
19. Krainer F. W., Glieder A. An updated view on horseradish peroxidases: Recombinant production and biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, vol. 99, pp. 1611–1625. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6346-7>
20. Ferapontova E., Domínguez E. Adsorption of differently charged forms of horseradish peroxidase on metal electrodes of different nature: Effect of surface charges. *Bioelectrochemistry*, 2002, vol. 55, iss. 1–2, pp. 127–130. [https://doi.org/10.1016/S1567-5394\(01\)00155-4](https://doi.org/10.1016/S1567-5394(01)00155-4)
21. Rennke H. G., Venkatachalam M. A. Chemical modification of horseradish peroxidase. Preparation and characterization of tracer enzymes with different isoelectric points. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1979, vol. 27, iss. 10, pp. 1352–1353. <https://doi.org/10.1177/27.10.41873>
22. Cloarec J. P., Chevalier C., Genest J., Beauvais J., Chamas H., Chevolut Y., Baron T., Souifi A. pH driven addressing of silicon nanowires onto Si₃N₄/SiO₂ micro-patterned surfaces. *Nanotechnology*, 2016, vol. 27, article no. 295602 (10 p.). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/29/295602>
23. Movillia J., Huskens J. Functionalized Polyelectrolytes for Bioengineered Interfaces and Biosensing Applications. *Organic Materials*, 2020, vol. 2, iss. 2, pp. 78–107. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1708494>
24. Poghossian A., Abouzar M. H., Amberger F., Mayer D., Han Y., Ingebrandt S., Offenhausser A., Schonring M. J. Field-effect sensors with charged macromolecules: Characterisation by. *Biosensors and Bioelectronics*, 2007, vol. 22, iss. 9–10, pp. 2100–2107. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.09.014>
25. Garyfallou G. Z., de Smet L. C. P. M., Sudhölter E. J. R. The effect of the Type of doping on the electrical characteristics of electrolyte–oxide–silicon sensors: pH sensing and polyelectrolyte adsorption. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, vol. 168, pp. 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.04.010>
26. Aué J., de Hosson J. T. Influence of atomic force microscope tip-sample interaction on the study of scaling behavior. *Applied Physics Letters*, 1997, vol. 71, iss. 10, pp. 1347–1349. <https://doi.org/10.1063/1.120415>
27. Makky A., Viel P., Chen S. W., Berthelot T., Pellequer J., Polesel-Maris J. Piezoelectric tuning fork probe for atomic force microscopy imaging and specific recognition force spectroscopy of an enzyme and its ligand. *J. Mol. Recognit.*, 2013, vol. 26, iss. 11, pp. 521–531. <https://doi.org/10.1002/jmr.2294>

Поступила в редакцию 29.06.2023; одобрена после рецензирования 24.07.2023; принята к публикации 25.08.2023
 The article was submitted 29.06.2023; approved after reviewing 24.07.2023; accepted for publication 25.08.2023