

УДК 612.015.1; 577.15.; 543.94

©Коллектив авторов

## РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ ПЕЧАТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ БИОСОВМЕСТИМЫМИ НАНОКОМПОЗИТАМИ НА ОСНОВЕ ГИБРИДНЫХ ОРГАНО-НЕОРГАНИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОСЕНСОРНОМ АНАЛИЗЕ

*В.В. Шумянцева<sup>1\*</sup>, Т.В. Булко<sup>1</sup>, А.В. Кузиков<sup>1</sup>, Р. Кхан<sup>2</sup>, А.И. Арчаков<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
ул. Погодинская, д. 10, 119121 Москва; тел.: 7(499)246-58-20; факс: 7(499)245-08-57;  
эл. почта: viktorina.shumyantseva@ibmc.msk.ru

<sup>2</sup>Analytical Chemistry Division, CSIR-North East Institute of Science & Technology,  
Jorhat, 785006, Assam, India (Северо-Восточный Институт науки и технологии,  
Отдел аналитической химии, Джорхат, Индия)

Для улучшения аналитических характеристик электродов, полученных методом трафаретной печати, разработаны новые типы нанокompозитных органо-неорганических матриц на основе наночастиц оксида титана (IV) (TiO<sub>2</sub>, размер частиц <100 нм), многостенных углеродных нанотрубок (CNT, внешний диаметр 10-15 нм, внутренний диаметр 2-6 нм, длина 0,1-10 мкм) и фосфатидилхолина. Исследованы электроаналитические и электрокинетические характеристики модифицированных электродов с иммобилизованным скелетным миоглобином. Аффинные матрицы охарактеризованы методом циклической вольтамперометрии, а также вольтамперометрического анализа (квадратно-волновой вольтамперометрии). При иммобилизации миоглобина на модифицированных электродах наблюдался прямой безмедиаторный перенос электронов между электродами, модифицированными оксидом титана или углеродными нанотрубками, и гемом миоглобина. Окислительно-восстановительный потенциал (полупотенциал) Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> миоглобина E<sub>1/2</sub> = -0,263 В для электродов, модифицированных CNT, для TiO<sub>2</sub> модификации электродов E<sub>1/2</sub> = -0,468 В (относительно хлорсеребряного электрода сравнения, Ag/AgCl).

**Ключевые слова:** ферментные электроды, нанокompозитные материалы, оксид титана, углеродные нанотрубки, миоглобин, перенос электронов.

DOI: 10.18097/PBMC20156104474

### ВВЕДЕНИЕ

Гемопротеины являются функционально значимым классом белков в организме [1]. Гемоглобин и миоглобин осуществляют транспорт молекул кислорода. Цитохром с переносит электроны в митохондриальной дыхательной цепи, является маркером апоптоза и гибели клеток. Цитохром с-оксидаза катализирует терминальное окисление с участием молекулярного кислорода; пероксидаза осуществляет окисление органических субстратов в присутствии пероксида водорода, а каталаза – разложение самого пероксида. Цитохромы P450 участвуют в гидроксировании органических молекул. Синтез оксида азота из L-аргинина катализирует NO-синтаза. Уровень самих гемопротеинов в органах, тканях и биологических

жидкостях – важный показатель нормального функционирования организма в целом, что делает перспективным создание различных тест-систем для экспресс-определения белков. Например, анализ крови на гемоглобин уже стал рутинным в медицинской практике. Модифицированные гемоглобины глутатион-гемоглобин, гликированный гемоглобин – являются маркерами заболеваний [2]. Миоглобин сердечной мышцы (кардиомиоглобин) является наиболее быстро появляющимся в крови маркером инфаркта миокарда из всех практически используемых в диагностике [3]. Ключевую роль в биотрансформации лекарственных препаратов играют цитохромы P450 [4, 5]. Многообразие функций гемопротеинов основано на окислительно-восстановительных свойствах железа гема в соответствии с реакцией  $Fe^{3+} + 1e \leftrightarrow Fe^{2+}$ .

\* - адресат для переписки

Редокс-активность каталитического центра гемопротеинов и широкий круг катализируемых ими реакций делают гемопротеины перспективными в создании электрохимических биосенсоров. Конструирование платформ для иммобилизации ферментов и детектирования сигнала вовлекает передовые нанотехнологии и различные типы наноматериалов.

Углеродные наноматериалы (одностеночные и многостеночные углеродные нанотрубки, графен, оксид графена, фуллерены, наноалмазы) широко используются для модификации различных типов электродов [6-9]. Многостеночные углеродные нанотрубки являются одними из самых востребованных углеродных наноматериалов вследствие коммерческой доступности, хорошей проводимости, биосовместимости, возможности химической модификации (например, окисление с образованием карбоксильных групп), наличия большой развитой поверхности. Модификация электродов углеродными нанотрубками (CNT) является также активно развивающейся областью сенсорного анализа. В наших исследованиях был использован метод диспергирования CNT в хлороформе с последующей ультразвуковой дезинтеграцией и нанесением суспензии на поверхность рабочего электрода (the casting methods).

Разработка новых биосовместимых наноматериалов для модификации электродов перспективна для разработки имплантируемых электрохимических биосенсоров [10, 11].

## МЕТОДИКА

Электрохимические измерения проводили с помощью потенциостата PGSTAT12 Autolab ("Eco Chemie", Нидерланды), снабжённого программным обеспечением GPES. Все измерения проводили при комнатной температуре в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0,05 М NaCl, pH 7,4. В работе использовали трёхконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО НПП "АВТОКОМ", Россия, <http://www.membranes-moscow.ru>), с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами (графитовая паста для печати фирмы "Achison", США), и хлорсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода 2 мм. Все потенциалы приведены относительно хлорсеребряного Ag/AgCl электрода сравнения.

Цикловольтамперограммы (CV) регистрировали при скорости развертки от 10 до 100 мВ/с. Параметры, используемые при исследовании квадратно-волновой вольтамперометрии: (КВВА, восстановление, аэробные условия) начальный потенциал 100 мВ, конечный потенциал -600 мВ, шаг потенциала 5 мВ, амплитуда 20 мВ, частота от 10 до 100 Гц.

Спектральные исследования проводили с помощью Cary 100 Scan UV-Vis спектрофотометра с программным обеспечением "Cary WinUV" ("Agilent", США).

Абсорбционные спектры поглощения скелетного миоглобина записывали после нанесения на прозрачные полихлорвиниловые пластины размером 4×2,5 мм 5 мкл суспензии оксида титана (IV), а затем 4 мкл 100 мкМ миоглобина. Пластины помещали в стандартные спектральные полистирольные кюветы объемом 1,5 мл. В качестве контроля использовали пластины с оксидом титана (IV).

## Реагенты

В работе использовали следующие реактивы: дидодецилдиметиламмоний бромид (DDAB), оксид титана (IV), <100 nm, скелетный миоглобин (Mb), феррицианид калия  $K_3Fe(CN)_6$  фирмы "Sigma-Aldrich" (США), многостеночные углеродные нанотрубки (Carbon nanotube, multi-walled O.D. 10-15 nm, I.D. 2-6 nm, length 0.1-10  $\mu m$ , >90% AS MWCNT, Arkema Inc. "Sigma-Aldrich", липоид С 100 ("Lipoid-GmBH", Германия) с содержанием фосфатидилхолина 78-95%, 5 мМ или 10 мМ раствор в хлороформе.

## Приготовление электродов

Для приготовления электродов, модифицированных углеродными нанотрубками (УН), готовили суспензию в хлороформе (1 мг/мл), затем озвучивали 1 мин и наносили на поверхность графитового электрода (2 мкл). После испарения хлороформа (10 мин) наносили 1 мкл исследуемого гемопротеина.

Для модификации поверхности электрода оксидом титана суспензию  $TiO_2$  1мг/0,5 мл ( $H_2O$ :  $C_2H_5OH$ , 1:1) озвучивали 1 ч, на поверхность электрода наносили 2 мкл суспензии, через 20 мин наносили 1 мкл исследуемого гемопротеина.

Электроды оставляли на 12 часов при +4°C во влажной камере, предотвращающей полное высыхание электродов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Многостеночные углеродные нанотрубки как модификаторы поверхности графитовых электродов

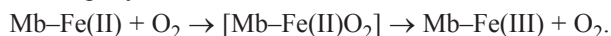
Основной задачей любого аналитического метода и диагностического устройства является повышение чувствительности (вплоть до регистрации единичных молекул) [12]. В современной электрохимии для этого применяются "размерные" эффекты, использующие физические и химические свойства наноразмерных частиц металлов, оксидов металлов и неметаллов, токопроводящих полимеров. Модификация поверхности электрохимического сенсора нанокompозитным материалом увеличивает активную поверхность и приводит к переходу работы сенсора в режим наносенора с улучшенными аналитическими характеристиками [13]. Такой подход позволяет применить фундаментальные исследования по получению нанокompозитных материалов для создания диагностических и аналитических методов для медицины, биотехнологии и сельского хозяйства с использованием единой системы получения и обработки результатов

измерений. Для регистрации эффективного прямого переноса электронов в гемопroteинах большое значение имеет материал электрода и модификация поверхности электрода. Снижение концентрации регистрируемого белка позволяет использовать соответствующие модификации в качестве сенсорных элементов для анализа биообъектов [14, 15].

Электрохимические эксперименты по исследованию электроактивности скелетного миоглобина были проведены с использованием трехконтактных электродов с рабочим графитовым электродом (диаметр 2 мм), получаемых методом трафаретной печати последовательным нанесением на пластиковую основу проводящих слоев и изоляции. Преимущества печатных электродов – миниатюризация электроанализа, возможность модификации рабочей поверхности электродов, низкий фоновый ток, широкий диапазон рабочих потенциалов [16].

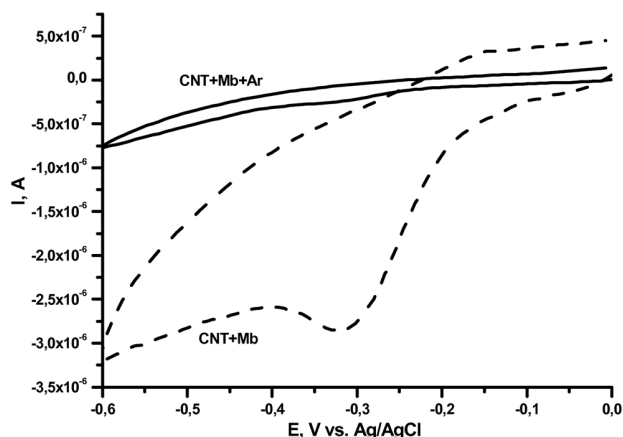
Для получения биодатчика электроды модифицированы скелетным миоглобином. Функциональная значимость миоглобина связана с тем, что повышение уровня миоглобина, в том числе и скелетного, в крови и моче является сигналом метаболических нарушений (миоглобинурий) в мышечной ткани [17]. Кардиоформа миоглобина (кардиомиоглобин) – один из ранних маркеров инфаркта миокарда. Кардиомиоглобин регистрируется в крови через 1-4 ч после приступа [18].

Углеродные нанотрубки (CNT, суспензия в хлороформе) наносили на графитовую рабочую поверхность печатного электрода. При иммобилизации миоглобина на поверхности рабочего электрода на циклической вольтамперограмме в анаэробных условиях наблюдали появление пары пиков: восстановления Fe(III)/Fe(II) и последующего окисления Fe(II)/Fe(III) железа гема. В присутствии кислорода восстановительный пик значительно возрастает, что свидетельствует о проявлении миоглобином каталитических свойств по отношению к кислороду в соответствии со схемой:

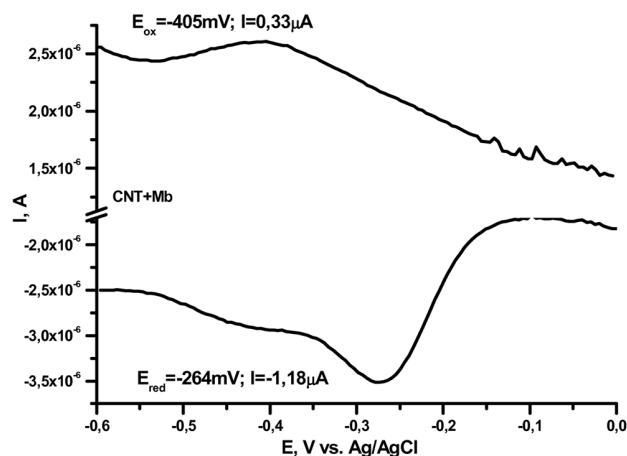


Таким образом, это подтверждает то, что кислород действительно взаимодействует с активным центром миоглобина и, таким образом, усиливая его восстановление; кроме того, проявление электрокаталитических свойств миоглобина в матрице УН свидетельствует о биосовместимости модификатора (рис. 1).

Одним из аппаратурных методов, широко применяемых для повышения чувствительности электрохимического анализа, является квадратно-волновая вольтамперометрия (КВВА). В данном методе для измерения сигнала на постоянную составляющую напряжения налагают переменную составляющую небольшой амплитуды прямоугольной формы с определенной частотой [19]. На рисунке 2 представлены квадратно-волновые вольтамперограммы миоглобина в аэробных условиях.



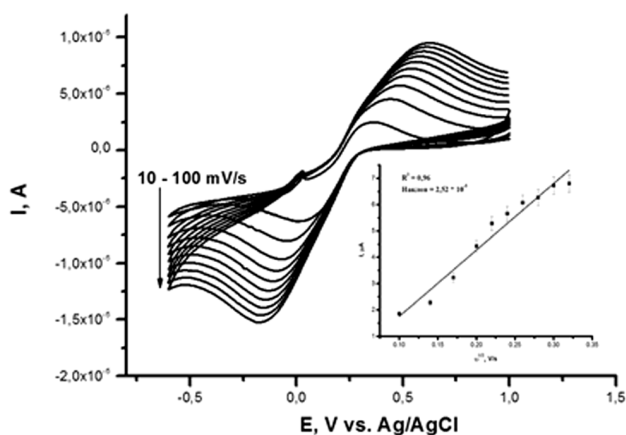
**Рисунок 1.** Циклические вольтамперограммы миоглобина (100 мкМ) в аэробных (сплошная линия) и анаэробных условиях (пунктирная линия) на электродах CNT/Mb. Скорость сканирования 0,07 В/с.



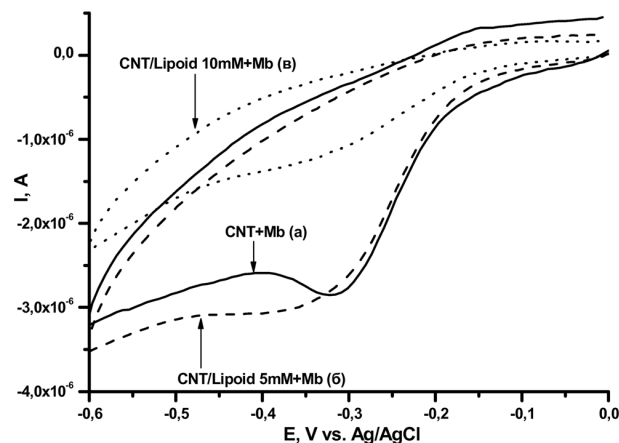
**Рисунок 2.** Квадратно-волновые вольтамперограммы (окислительная и восстановительная кривые) электродов CNT/Mb, 0,1 М фосфатный буфер, pH=7,4, частота 10 Гц, аэробные условия.

С помощью метода КВВА регистрируются как восстановительный, так и окислительный пик миоглобина даже в присутствии кислорода. Это подтверждает то, что данный метод измерения сигнала является более чувствительным, а миоглобин, иммобилизованный на электродах, модифицированных углеродными нанотрубками, сохраняет свои электрохимические свойства. В отсутствие миоглобина, сигнал не наблюдается.

Важной аналитической характеристикой электродов является электроактивная площадь. Активная площадь электродов была рассчитана в 5 мМ растворе феррицианида калия  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  + 1 М КСl в соответствии с уравнением Рэндлса-Шевчика [19] (таблица). Модификация электрода углеродными нанотрубками существенно увеличивает электроактивную площадь поверхности печатного графитового электрода (рис. 3).



**Рисунок 3.** Циклические вольтамперограммы раствора 5 мМ  $K_3[Fe(CN)_6]$  + 1 М КСl при различных скоростях развертки потенциала (10-100 мВ/с). Печатный графитовый электрод модифицирован 2 мкл суспензии углеродных нанотрубок в хлороформе (1 мг/мл).



**Рисунок 4.** Циклические вольтамперограммы миоглобина (100 мкМ) в аэробных условиях на электродах: CNT/Мб (а); CNT/липоид С 100/Мб (5 мМ липоид С 100), (б); CNTПГЭ/УН/липоид С 100/Мб (10 мМ липоид С 100), (в). Скорость сканирования 0,07 В/с.

**Таблица.** Сравнение электроактивной площади модифицированных печатных электродов.

|                             | Активная площадь электрода, см <sup>2</sup> (*) | ΔE, В (**) |
|-----------------------------|---|------------|
| CNT                         | 0,0024  | 0,642      |
| TiO <sub>2</sub>            | 0,0006  | 0,771      |
| DDAB***                     | 0,0004  | 0,142      |
| Немодифицированный электрод | 0,0005  | 0,897      |

Примечание: \* - площадь рабочего электрода 0,0314 см<sup>2</sup>,  
 \*\* - ΔE при скорости развёртки 0,05 В/с,  
 \*\*\* - диметилдидодециламмония бромид.

Интегрирование восстановительного пика миоглобина циклической вольтамперограммы электродов, модифицированных CNT, позволяет рассчитать количество электроактивного гемопротейна (Г) на поверхности электрода в комплексе с кислородом по формуле  $G = Q/nAF$ , где Q – количество переносимого электричества (заряд), Кл, F – константа Фарадея, 96484,6 Кл/моль, n – число переносимых в ходе реакции электронов, A – геометрическая площадь электрода. Фракция электроактивного белка составляет  $30 \pm 5 \times 10^{-12}$  моль/электрод (или при пересчете на см<sup>2</sup> –  $955 \times 10^{-12}$  моль/см<sup>2</sup>).

Для стабилизации электродов была исследована модификация электродов CNT с помощью фосфолипидного препарата липоид С 100 (на основе фосфатидилхолина, 5 или 10 мМ раствор в хлороформе). Однако, данные циклической и квадратно-волновой вольтамперометрии электродов CNT/липоид С/Мб указывают на то, что такая дополнительная модификация не способствует улучшению стабильности электрода и улучшению процессов прямого переноса электронов в исследуемом гемопротейне (рис. 4).

## 2. Наночастицы оксида титана как модификаторы поверхности графитовых электродов

Оксид титана (неорганический полупроводник n-типа) в последнее время широко используется в различных областях: для создания солнечных батарей (благодаря способности к фотоактивации) [20], в биомедицине, в электронике, при разработке биосенсоров для модификации электродов вследствие высокой площади поверхности, оптической прозрачности, хорошей биосовместимости [21-24].

Суспензия оксида титана в смеси вода:этанол (1:1) была приготовлена при ультразвуковой дезинтеграции. Для модификации электродов на поверхность графитового рабочего электрода наносили наночастицы TiO<sub>2</sub>. Миоглобин наносили на слой наночастиц TiO<sub>2</sub>. Спектры поглощения миоглобина в слое оксида титана на поверхности полистирольных пластинок (рис. 5) демонстрируют характерное поглощение в области полосы Сор при  $\lambda = 413$  нм. Электроактивная поверхность электрода, модифицированного TiO<sub>2</sub>, составляет 0,0006 см<sup>2</sup>, что несколько меньше, чем активная площадь электродов, модифицированных углеродными нанотрубками (таблица) и сравнима с немодифицированным графитовым электродом. Однако на немодифицированном графитовом электроде иммобилизация гемопротейнов не происходит.

При иммобилизации миоглобина на электроды, модифицированные TiO<sub>2</sub>, на циклической вольтамперограмме в аэробных условиях наблюдали пик восстановления железа гема в области потенциалов, характерных для гемопротейнов [25, 26] (рис. 6). С помощью метода КВВА на электродах, модифицированных TiO<sub>2</sub>, регистрируются как восстановительный, так и окислительный пик миоглобина даже в присутствии кислорода. Окислительно-восстановительный потенциал (полупотенциал)  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  миоглобина  $E_{1/2} = 0,468$  В.



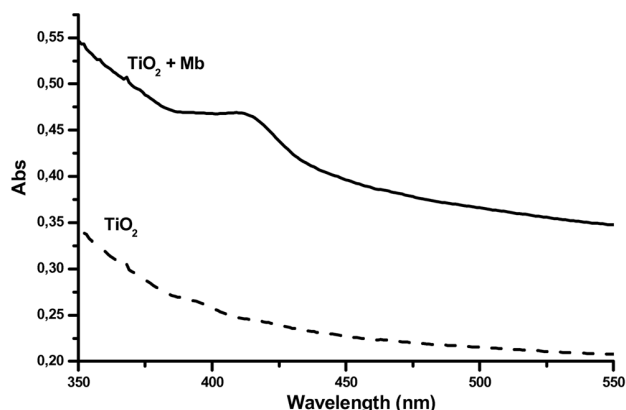


Рисунок 5. Спектры поглощения миоглобина на полихлорвиниловых пластинах, модифицированных  $\text{TiO}_2$ .

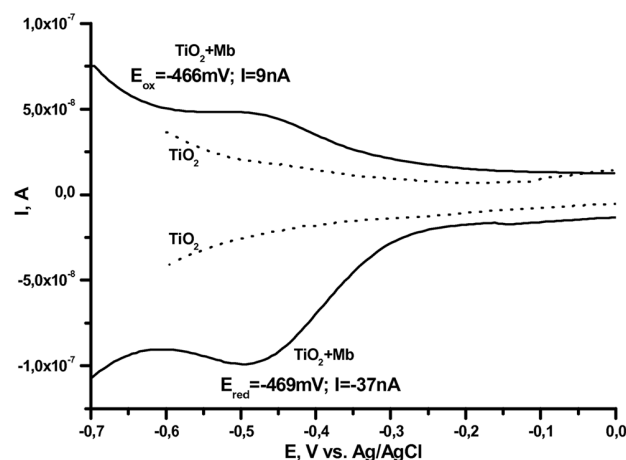


Рисунок 6. Квадратно-волновые вольтамперограммы (окислительная и восстановительная кривые)  $\text{TiO}_2/\text{Mb}$ , 0,1 М фосфатный буфер, pH=7,4, частота 10 Гц, аэробные условия.

Как и в случае электродов, модифицированных CNT, липид С 100 (в концентрации 5 мМ и 10 мМ) не оказывал положительного влияния на электронтранспортные свойства электродов, модифицированных  $\text{TiO}_2$ . Восстановительный потенциал миоглобина на электроде, модифицированном  $\text{TiO}_2$ /липоид С 100 (5 мМ), смещён в более отрицательную область, что свидетельствует о затруднении восстановления гема по сравнению с модификацией  $\text{TiO}_2$ .

Фосфатные группы имеют большую аффинность к оксиду титана. Это свойство использовалось для обогащения белковых фракций, содержащих фосфорилированные белки [27, 28], для электрохимического анализа каталитических свойств FAD [24]. Использование  $\text{TiO}_2$  для модификации электродов перспективно для анализа фосфорилированных производных аминокислот и пептидов при анализе активности киназ [29].

Таким образом, нанокompозитные материалы на основе многостеночных углеродных нанотрубок и оксида титана могут быть использованы для электроанализа гемопротеинов и исследования их каталитических свойств.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта №13-04-92695.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Шумянцева В.В., Супрун Е.В., Булко Т.В., Добрынина О.В., Арчаков А.И. (2010) Биомед. химия, **56**, 55-71.
2. Dalle-Donne I., Scaloni A., Butterfield D.A. (2006) Redox Proteomics, Wiley Interscience, 651-667.
3. Hasanzadeh M., Shadjou N., Eskandani M., Omidinia M. (2013) Trends Anal. Chem., **49**, 20-30.
4. Lewis D.F.V. (2001) Guide to Cytochrome P450. Structure and function. Taylor and Francis Eds., London and New York.
5. Archakov A.I., Bachmanova G.I. (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen, Taylor and Francis, London.
6. Hu C., Hu S. (2009) J. Sensors. Article ID 187615, 1-40.
7. Zhang W., Chen M., Gong X., Diao G. (2013) Carbon, **61**, 154-163.
8. Jia L., Lu Y., Shao J., Liang X., Xu Y. (2013) Trends Biotechnol., **31**, 99-107.
9. Justino C., Rocha-Santos T., Duarte A. (2013) Trends Anal. Chem., **45**, 24-36.
10. Kotanena C., Moussy F., Carrara S., Guiseppi-Elie A. (2012) Biosens. Bioelectron., **35**, 14-26.
11. Howladera M., Doyle T., Mohtashami S., Kish J. (2013) Sensors Actuators B, **178**, 132-139.
12. Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. (2009) Proteomics, **9**, 1326-1343.
13. Xiao Y., Li C. (2008) Electroanalysis, **20**, 648-662.
14. Suprun E., Bulko T., Lisitsa A., Gnedenko O., Ivanov A., Shumyantseva V., Archakov A. (2010) Biosens. Bioelectron., **25**, 1694-1698.
15. Suprun E., Saveliev A., Evtugyn G., Lisitsa A., Bulko T., Shumyantseva V., Archakov A. (2012) Biosens. Bioelectron., **15**, 158-164.
16. Kulys J., D'Costa E.J. (1991) Biosens. Bioelectron., **6**, 109-115.
17. Папышев И. (2010) Вестник РГМУ, 2010, **5**, 69-72.
18. McDonnell B., McDonnell S., Hearty S., Leonard P., O'Kennedy R. (2009) Clin. Biochem. **42**, 549-561.
19. Шольц Ф. (2006) Электроаналитические методы. Теория и практика, М., БИНОМ. Лаборатория знаний.
20. Fujishima A., Zhang X. (2006) C. R. Chimie, **9**, 750-760.
21. Li Q., Luo G., Feng J. (2001) Electroanalysis, **13**, 359-363.
22. Kamat P. (2012) J. Phys. Chem. C, **116**, 11849-11851.
23. Sun W., Guo Y., Ju X., Zhang Y., Wang X., Sun Z. (2013) Biosens. Bioelectron., **42**, 207-213.
24. Kumar A., Lo P., Chen S. (2008) Nanotechnology, **19**, 255501, 1-7.
25. Bistolas N., Wollenberger U., Jung C., Scheller F.W. (2005) Biosens Bioelectron., **20**, 2408-2423.
26. Shumyantseva V., Bulko T., Suprun E., Chalenko Y., Vagin M., Rudakov Y., Shatskaya M., Archakov A. (2011) Biochim. Biophys. Acta, (Proteins and Proteomics), **1814**, 94-101.
27. Li S., Wang J., Wei H., Yang Y., Bu D., Zhang L., Zhou L. (2012) J. Integrative Agr., **11**, 439-445.
28. Zeng Y., Chen H., Shiao K., Hung S., Wang Y., Wu C. (2012) **12**, 380-390.
29. He X., Chen Z., Wang Y., Wang K., Su J., Yan G. (2012) Biosens. Bioelectron., **35**, 134-139.

Поступила: 27. 12. 2013.

FUNCTIONALIZATION OF SCREEN PRINTED ELECTRODES WITH ORGANIC-INORGANIC  
HYBRID NANO-COMPOSITES FOR BIO-SENSING APPLICATIONS

*V.V. Shumyantseva<sup>1</sup>, T.V. Bulko<sup>1</sup>, A.V. Kuzikov<sup>1</sup>, R. Khan<sup>2</sup>, A.I. Archakov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel. +7(499)2465820; fax: +7(499)2450857;  
e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

<sup>2</sup>Analytical Chemistry Division at CSIR North East Institute of Science & Technology, Jorhat, Assam, India

New types of organic-inorganic hybrid nanocomposites based on nanosized Titanium (IV) oxide TiO<sub>2</sub> (<100 nm particle size) and carbon nanotubes (CNT, outer diameter 10-15 nm, inner diameter 2-6 nm, length 0.1-10 μm) and phosphatidylcholine were elaborated for improvement of analytical characteristics of screen printed electrodes. These nanomaterials were employed as an interface for the immobilization of skeletal myoglobin. Electrochemical behavior of myoglobin on such interfaces was characterized with cyclic voltammetry (CV) and square wave voltammetry (SWV). Direct unmediated electron transfer between myoglobin and electrodes modified with organic-inorganic hybrid nanocomposites was registered. TiO<sub>2</sub> film and CNT film are biocompatible nanomaterials for myoglobin as was demonstrated with UV-Vis spectra. The midpoint potential of Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> pair of myoglobin corresponded to E<sub>1/2</sub> = -0,263 V for CNT film, and E<sub>1/2</sub> = -0,468 V for TiO<sub>2</sub> nanocomposite (vs. Ag/AgCl reference electrode).

**Key words:** enzyme electrodes, nanomaterials, Titanium oxide, carbon nanotubes, myoglobin, electron transfer.