

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА «ІНСТИТУТ ХАРЧОВОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА
ГЕНОМІКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ»**

СОЛДАТКІНА ОЛЬГА ВАСИЛІВНА



УДК 543.06+577.15+544.076.32

**ВИКОРИСТАННЯ НАНО- ТА МІКРОРОЗМІРНИХ МАТЕРІАЛІВ ДЛЯ
РОЗРОБКИ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ СЕНСОРІВ З ПОКРАЩЕНИМИ
АНАЛІТИЧНИМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертація є рукописом

Роботу виконано на кафедрі молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка та в лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики Національної академії наук України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Дзядевич Сергій Вікторович,
Інститут молекулярної біології і генетики
Національної академії наук України,
головний науковий співробітник лабораторії
біомолекулярної електроніки відділу механізмів
трансляції генетичної інформації

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Курдиш Іван Кирилович,
Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного
Національної академії наук України,
завідувач відділу мікробіологічних процесів
на твердих поверхнях

доктор біологічних наук, професор
Борисова Тетяна Олександрівна,
Інститут біохімії імені О. В. Палладіна
Національної академії наук України,
завідувач відділу нейрохімії

Захист дисертації відбудеться «22» квітня 2019 р., об 11⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.254.01 Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» за адресою: 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2А, тел./факс: (044) 434-37-77, e-mail: d 26.254.01 @ukr.net

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України» за адресою: 04123, Київ вул. Осиповського, 2А.

Автореферат розісланий «22» березня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
к.б.н., доцент



Н.Л. Пастухова

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. На сьогодні у всьому світі все більше зусиль прикладається для розробки експресних та точних біоаналітичних методів аналізу для потреб медичної діагностики, спрощення біотехнологічних процесів та екологічного моніторингу довкілля. Біосенсорні методи представляють собою один із перспективних біотехнологічних підходів, адже мають ряд переваг у порівнянні з методами аналізу, що традиційно застосовують для даних цілей. Біосенсори являють собою групу новітніх аналітичних пристроїв, що складаються з біоселективного матеріалу і перетворювача, що знаходяться у тісному контакті (Thevenot et al., 2001). Розробка біосенсорів є актуальним завданням біотехнології, оскільки вони є високо селективними, чутливими, портативними і простішими у використанні у порівнянні з класичними методами аналізу. Не менш важливими перевагами біосенсорів є також їхні вартісні характеристики, які є значно нижчими у порівнянні з майже усіма альтернативними та загальноприйнятими методами.

Спектр використання біосенсорів є досить широким. Передбачається, що у майбутньому біосенсори будуть широко застосовуватись в медицині, сільському господарстві, ветеринарії, для контролю різних біотехнологічних процесів, а також для моніторингу навколишнього середовища. Слід відмітити, що в цих галузях застосування біосенсорів щорічно збільшується приблизно на 30%.

Новим перспективним напрямком біотехнології є використання нанорозмірних матеріалів різної природи, яким притаманні певні унікальні фізичні та хімічні властивості. Наноматеріали (НМ) — сучасні перспективні речовини з розміром елементів структури 1–100 нм. Властивості та функції наноматеріалів значно відрізняються від аналогічних матеріалів у макророзмірному стані. При розробці біосенсорів, наноматеріали використовують для покращення основних аналітичних характеристик біосенсорів, таких як чутливість, лінійний діапазон визначення, селективність, відтворюваність, стабільність, швидкість аналізу тощо. Наноматеріали мають унікальні властивості, зокрема високий рівень співвідношення площа поверхні/об'єм. Отже, при необхідності, такі особливості будови наноматеріалів дають можливість значно збільшити площу чутливої ділянки перетворювача для забезпечення більш ефективної адсорбції на ній біологічного матеріалу. Крім того, наноматеріали характеризуються високими реактивністю та електропровідністю, магнітними властивостями, каталітичною активністю, тощо (Maduraiveeran and Jin, 2017). Активні ділянки та функціональні групи на поверхні наноматеріалів забезпечують їх високу каталітичну та адсорбційну активність, що пояснює перспективність їх використання як при розробці біосенсорів, так і в інших біотехнологічних методах аналізу (Kurbanoglu et al., 2017). У біосенсорних технологіях застосовують неорганічні наночастинки (метали та їх оксиди, цеоліти, квантові точки тощо) та органічні (каліксарени, фулерени та ін.). Неорганічні наноматеріали характеризуються досить простим процесом синтезу, є каталізаторами деяких електрохімічних реакцій, а також беруть участь у процесі прискорення переносу електронів. Органічні наночастинки характеризуються низкою властивостей, які сприяють підсиленню електрохімічного сигналу та проявляють

високу ступінь біосумісності (Kurbanoglu et al., 2017). Це, безперечно, робить їх зручними при розробці електрохімічних сенсорів (Li et al., 2014).

При розробці сенсорів можливі різні шляхи використання наночастинок для покращення робочих параметрів сенсорів: вони можуть бути коїмобілізовані разом із біологічною компонентою, або ж інтегровані в поверхню перетворювача. Також, деякі наночастинок можна застосовувати як селективний елемент хемосенсорів. Це забезпечує широкий спектр підходів до вдосконалення аналітичних характеристик біосенсорних пристроїв. Отже, в залежності від поставлених задач, можна контролювано змінювати необхідні характеристики сенсорів, підбравши відповідний наноматеріал та розробивши процедуру його застосування.

Тому, розробка нових та вдосконалення існуючих методів покращення аналітичних характеристик біосенсорів за рахунок використання нано- та мікроматеріалів є вельми актуальним напрямком аналітичної біотехнології.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась на кафедрі молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка та в лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках проєктів: НДР № 16БФ07-03 «Комп'ютерне моделювання та експериментальні дослідження біологічних наноконструктивних комплексів» та УНТЦ «Використання функціональних наноматеріалів для сворення біосенсорних кондуктометричних приладів для визначення аргініну» (№ 0116U007099).

Мета та завдання дослідження. Мета дисертаційної роботи полягала в розробці нових біотехнологічних підходів використання мікро- та нанорозмірних матеріалів для покращення аналітичних характеристик електрохімічних сенсорів.

Для досягнення вказаної мети було поставлено ряд завдань:

- Оцінити можливість та перспективність методики коїмобілізації цеолітів з ферментами при розробці електрохімічних біосенсорів з покращеними аналітичними характеристиками.
- Розробити новий метод іммобілізації біологічного матеріалу на основі адсорбції ферментів на електрохімічних перетворювачах, модифікованих наночастинками цеолітів.
- Розробити методику покращення аналітичних характеристик амперометричного перетворювача за рахунок нанесення додаткової мембрани на основі поліфенілендіаміну.
- Показати принципову можливість створення хемосенсорів на основі каліксаренів для визначення аргініну.
- Створити лабораторні прототипи біо- і хемосенсорів на основі запропонованих методик використання мікро- і нанорозмірних матеріалів та дослідити їхні аналітичні характеристики.

Об'єкт дослідження – біохімічні реакції за участі ферментів, іммобілізованих на поверхню перетворювачів з використанням різних мікро- та наноматеріалів.

Предмет дослідження – електрохімічні ферментні біосенсори на основі цеолітів; амперометричний перетворювач, вкритий шаром поліфенілендіаміну; кондуктометричний хемосенсор на основі каліксарену.

Методи дослідження: електрохімічні та спектрофотометричні методи дослідження ферментативних реакцій, амперометричний метод, кондуктометричний метод, потенціометричний метод, хроматографічний метод, методи іммобілізації ферменту (ковалентна зшивка та фізична сорбція), статистичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. В роботі вперше показано можливість використання цеолітів у складі електрохімічних біосенсорів на основі низки ферментів (уреаза, глюкозооксидаза, глутаматоксидаза, ацетилхолінестераза, аргіназа) для прямого визначення відповідних субстратів.

Запропоновано новий метод іммобілізації біологічного матеріалу - адсорбцію ферментів на поверхні електрохімічних перетворювачів, модифікованих шаром цеолітів.

Вперше оптимізовано методику нанесення поліфенілендіамінової мембрани на дискові платинові електроди, що забезпечує значне зменшення впливу електроактивних інтерферуючих речовин на роботу біосенсора.

Вперше було розроблено кондуктометричний хемосенсор на основі каліксаренової мембрани для селективного визначення аргініну та проведено аналіз основних аналітичних характеристик розробленого сенсора.

Практичне значення одержаних результатів. Створено низку лабораторних зразків електрохімічних сенсорів на основі мікро- та наноматеріалів для визначення глюкози, сечовини, глутамату, ацетилхоліну, аргініну з використанням розроблених в роботі нових підходів покращення аналітичних характеристик сенсорів. Простота і швидкість виготовлення, гарна відтворюваність приготування, відсутність необхідності використання при створенні сенсорів токсичних сполук, разом з покращеними параметрами самих сенсорів є важливими характеристиками для процесу їх метрологічної атестації, стандартизації та подальшого виробництва.

Особистий внесок здобувача. Спільно з науковим керівником складено план проведення досліджень, поставлено ряд завдань, підібрано методи дослідження для виконання поставлених задач і самостійно виконано експерименти, що описані в даній дисертаційній роботі. Автором опрацьовано літературу за темою дисертаційної роботи. Спільно із співавторами було здійснено підготовку статей та тез доповідей до друку у профільних наукових виданнях. Здобувачем самостійно розроблено лабораторні прототипи біосенсорів на основі нанорозмірних матеріалів з удосконаленими основними аналітичними характеристиками.

Апробація матеріалів дисертації. Результати дисертаційної роботи були представлені на 6 фахових конференціях: IV Международная научно-практическая интернет-конференция «Актуальные научные исследования в современном мире» (Переяслав-Хмельницький, Україна, 21-22 серпня 2015); International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (Львів, Україна, 24-27 серпня 2016); V Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, Україна, 12-13 травня 2016); International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials»

(Чернівці, Україна, 23-26 серпня 2017); 8-ма Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, Україна, 28 травня - 1 червня 2018); International research and practice conference Nanotechnology and nanomaterials (Київ, Україна, 27-30 серпня 2018).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 14 праць, з них 6 статей (в т.ч. 5 – у зарубіжних журналах), 1 патент на корисну модель та 7 тез доповідей у профільних наукових виданнях та збірниках матеріалів конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, експериментальної частини, яка складається з трьох розділів, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, який включає 174 найменування. Робота викладена на 177 сторінках машинописного тексту. Результати дисертації та допоміжні матеріали проілюстровано 51 рисунком та представлено в 13 таблицях.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У першому розділі (огляді літератури) проаналізовано тенденції використання мікро- та нанорозмірних матеріалів різної природи при розробці сенсорних приладів для покращення їхніх аналітичних характеристик. Описано сенсори на основі наноматеріалів, які вирізняються надвисокою чутливістю і відмінною стабільністю при зберіганні. Велику увагу приділено розробці нових та вдосконалення існуючих методів покращення аналітичних характеристик сенсорних приладів за рахунок використання нано- та мікроматеріалів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі використовувались наступні ферменти: глюкозооксидаза (ГОД, КФ 1.1.3.4) із *Penicillium vitale* з активністю 130 од.акт./мг фірми «Діагностикум» (Львів), уреаза (КФ 3.5.1.5) із *Canavalia ensiformis* з активністю 66,3 од. акт./мг фірми Fluka (Швейцарія), глутаматоксидаза (ГлОД, КФ 1.4.3.11) із *Streptomyces sp.* з активністю 7 од.акт./мг фірми «Yamasa Corporation» (Токіо, Японія), рекомбінантна уреаза із *E.coli* (КФ 3.5.1.5) активністю 150 од.акт./мг виробництва фірми «Usbiological» (США), аргіназа (КФ 3.5.3.1) із печінки бика з активністю 105 од. акт./мг фірми «Sigma-Aldrich» (США), ацетилхолінестераза (АцХЕ, КФ 3.1.1.7) із електричного вугря з активністю 426 од.акт./мг та бутирилхолінестераза (БуХЕ, КФ 3.1.1.8) із сировотки крові коня з активністю 13 од.акт./мг фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (Німеччина).

Інші компоненти селективних елементів: бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V), 50% водний розчин глутарового альдегіду (ГА), гліцерин, *m*-фенілендіамін були виробництва фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (США).

Субстрати та інтерферуючі речовини: аргінін, ацетилхолін, бутирилхолін хлорид, сечовина, глюкоза, глутамат, аскорбінова та сечова кислоти, водний розчин перекису водню, цистеїн, дофамін були виробництва «Sigma-Aldrich Chemie» (Франція та Німеччина), набір амінокислот – виробництва фірми «Sigma» (США).

Цеоліти: силікаліти, Бета-цеоліти з різним співвідношенням Si/Al, цеоліт А, цеоліт L та мезопористі кремнієві сфери були синтезовані у Середньо-Східному технічному університеті (Анкара, Туреччина). Кристали цеоліту Бета у формі NH₄⁺,

отримували з використанням методики (Creighton et al., 1997). Зразки Бета-1 отримували шляхом нагрівання від + 25 до + 500 °С зі швидкістю 1 °С /хв, Бета-2 - нагрівання до + 700 °С зі швидкістю 10 °С /хв, та Бета-3 – нагрівання до + 700 °С зі швидкістю 1 °С /хв. Далі зразки витримували 6 годин за кімнатної температури. Каліксарен (ди-(3-метилсульфідпропокси) калікс[4]арен метиленбісфосфонова кислота) було синтезовано в Інституті органічної хімії НАН України.

Як робочі буферні розчини використовували: HEPES фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (США), ТРИС фірми «Sigma–Aldrich Chemie» (Німеччина) та калій-фосфатний буфер (ФБ) вітчизняного виробництва. Усі інші неорганічні сполуки були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «х.ч.» та «ч.д.а.».

Муказол та поліетиленімін були виробництва фірми Sigma-Aldrich (США).

Електрохімічні перетворювачі, що використовувались в роботі: амперометричні перетворювачі на основі платинових дискових електродів власного виробництва (Soldatkina et al., 2017); амперометричні перетворювачі на основі планарних тонкоплівкових нікелевих електродів, виготовлені в Інституті електродинаміки НАН України (Кучеренко та ін., 2014); тонкоплівчасті кондуктометричні перетворювачі на основі двох ідентичних пар золотих зустрічно-гребінчастих електродів (Дзядевич та Солдаткін, 2006) та потенціометричні перетворювачі на основі рН-чутливих польових транзисторів (Солдаткін та ін., 2018), виготовлені в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України.

Для нанесення додаткової мембрани на основі полі-*m*-фенілендіаміну (ПФД) на поверхню амперометричного перетворювача, його очищували 96% етиловим спиртом, проводили шліфування поверхні за допомогою частинок оксиду алюмінію (0,3 і 0,5 мкм) та ще раз обробляли спиртом. Очищений перетворювач підключали до експериментальної установки та занурювали у вимірювальну комірку з розчином 5 мМ *m*-фенілендіаміну. Далі отримували циклічні вольтамперограми (ЦВА) (потенціал від 0 до + 0,9 В, швидкість – 20 мВ/с, крок зміни потенціалу – 5 мВ).

Формування шару цеолітів на поверхні перетворювачів на основі золота та платини відбувалось за рахунок, так званої, процедури повного покриття «*dip coating*». Для цього 0,15 мкл колоїдного розчину цеоліту (5-10 ваг %) наносили на перетворювач, після чого проводили нагрівання перетворювача до 150-200 °С (3-7 хв). Нанесення цеолітів на поверхню нікелевих амперометричних перетворювачів та ІСПТ проводили інакше. Спершу поверхню перетворювача обробляли розчином муказолу протягом 15 хв для збільшення її гідрофільності та наносили шар 0,5 % поліетиленіміну за методом центригування «*spin coating*» (15 с при 3,000 об./хв.), після чого перетворювачі витримували при температурі + 100 °С (30 хв). Далі наносили цеоліти, які прикріплювалися до шару поліетиленіміну.

Для формування шару каліксарену на поверхні кондуктометричного перетворювача, 0,1 мкл каліксаренового розчину у ДМСО наносили на його активні ділянки, після чого перетворювач нагрівали 5 хв (80 °С).

Для виготовлення біоселективних мембран шляхом іммобілізації ферментів в насичених парах ГА використовували наступні розчини: 1) 5 % ГОД, 5 % БСА, 10 % гліцеролу у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,75; 2) 10 % уреазі, 10 % БСА, 10 %

гліцеролу у 20 мМ фосфатному буфері; 3) 8 % ГЛОД, 4 % БСА, 10 % гліцеролу у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2. Суміші для референтних мембран готували таким же чином, але замість ферментів використовували тільки БСА з концентрацією білку 10 – 20 % для забезпечення однакового вмісту білку у робочій і референтній мембранах. Приготовані суміші для робочих і референтних мембран наносили на відповідні чутливі ділянки перетворювачів. Далі перетворювачі з мембранами занурювали у насичені пари ГА (15-30 хв.), а потім висушували протягом 15 хв. на повітрі. Перед використанням, біосенсори промивали в робочому буферному розчині для видалення незв'язаних компонентів мембран.

Для адсорбції ферментів поверх шару цеоліту, 0,1-0,15 мкл розчину 5% ферменту (ГОД, ГЛОД, АцХЕ, БуХЕ, уреазу та рекомбінантної уреазу) у робочому буфері наносили на чутливу ділянку перетворювача, а розчин БСА – на іншу ділянку перетворювача для формування референтної мембрани. Далі біосенсори залишали на повітрі (5-20 хв), після чого проводили їх відмивку від незв'язаного ферменту в робочому буфері (3 рази по 2 хв).

Для виготовлення біоселективних елементів шляхом коїммобілізації цеолітів і ферментів, розчин (10 % ферменту, 10 % БСА, 10 % гліцеролу у 20 мМ ФБ, рН 6,75) або розчин для референтної мембрани (20% БСА та 10% гліцеролу у такому ж буфері) змішували з 10 % колоїдним розчином частинок у пропорції 1:1, і наносили на відповідні чутливі області перетворювачів. Далі перетворювачі занурювали у насичені пари ГА на 30 хв, після чого висушували протягом 15 хв. на повітрі. Перед використанням біосенсори промивали у робочому буферному розчині для видалення незв'язаних компонентів мембран.

В роботі використовували триелектродну схему амперометричного аналізу. Амперометричні перетворювачі разом із допоміжним платиновим електродом та електродом порівняння Ag/AgCl підключали до потенціостату PalmSens (Нідерланди) (Borisova et al., 2018). Вимірювання з використанням рН-чутливих польових транзисторів проводили за допомогою портативного приладу, який було сконструйовано в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України (Soldatkin et al., 2018).

Кондуктометричні перетворювачі під'єднували до портативного приладу, що був виготовлений в Інституті електродинаміки НАН України. Технічні характеристики та умови експлуатації даного приладу детально описані у роботі (Saiarina et al., 2011). Також для вимірювання зміни провідності в приелектродному шарі кондуктометричного перетворювача, в роботі використовувалась стаціонарна кондуктометрична вимірювальна установка (Soldatkin et al., 2008.)

Усі біосенсорні вимірювання проводилися за кімнатної температури у відповідному буферному розчині, у відкритій робочій комірці (1,5-3 мл) при постійному перемішуванні. Концентрація субстратів задавалась введенням відповідних аліквот стандартного вихідного розчину субстрату до вимірювальної комірки з робочим буфером. Під час вимірювань, неспецифічні зміни сигналу біосенсора, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища, тощо, пригнічувалися завдяки використанню у роботі диференційного режиму вимірювання. Всі експерименти виконувалися, щонайменше, у трьох повторях.

Для оцінки коректності біосенсорного визначення сечовини, отримані результати було порівняно з результатами, отриманими методом колориметричного ферментативного визначення сечовини, в основі якого лежить гідроліз сечовини уреазою до амонію та вуглецевої кислоти, і колориметричному вимірюванні кількості амонію.

Хроматографічний аналіз комплексоутворення каліксарену з аргініном та іншими амінокислотами проводили за допомогою хроматографічної системи «Hitachi» (Японія), методика проведення описана в роботі (Soldatkin et al., 2018).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Перспективи використання цеолітів при виготовленні електрохімічних біосенсорів. Цеоліти являють собою мікро та наночастинки, в основі структури яких лежить кристалічна ґратка з атомів силіцію, алюмінію та кисню. Різноманітні властивості цеолітів, такі як іонно-обмінна поведінка, розмір частинок, поверхневі групи, розмір пор та співвідношення Si/Al можна змінювати з метою отримання оптимальних характеристик біосенсорів, розроблених на їх основі.

Існує два основні варіанти використання цеолітів при розробці біосенсорів: (А) – використання цеолітів як адсорбентів ферментів та (Б) – додавання цеолітів до складу біоселективного елементу біосенсора. Обидва підходи було порівняно з біосенсорами, виготовленими з використанням традиційного методу – ковалентної зшивки ферментів і БСА за допомогою ГА (В). Схематично ці підходи представлені на рис. 1.

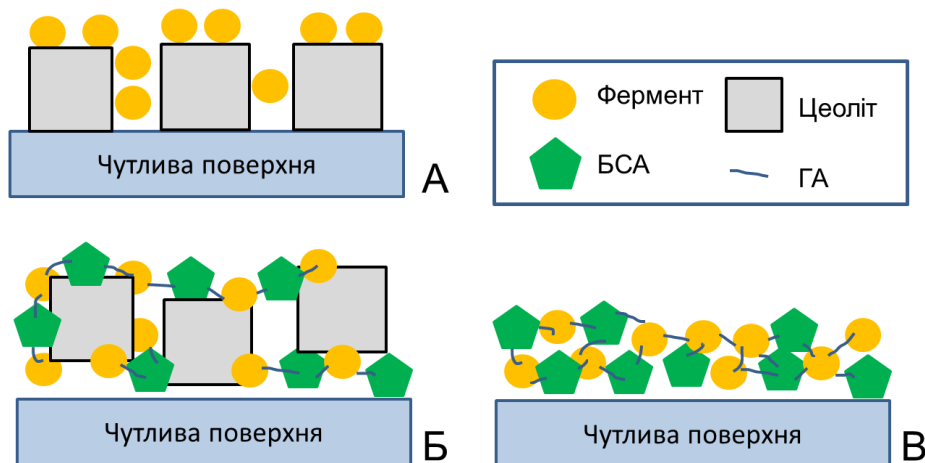


Рис.1. Варіанти використання цеолітів при виготовленні біосенсорів. (А) – використання цеолітів як адсорбентів ферментів; (Б) – додавання цеолітів до складу біоселективного елементу біосенсора; (В) – ковалентної зшивки ферментів і БСА з ГА

На першому етапі роботи було проведено коїммобілізацію цеолітів і ферментів, а також перевірено вплив трьох модифікацій цеоліту Бета 30 (Na^+ -Бета 30, NH_4^+ -Бета 30 та H^+ -Бета 30) на роботу кондуктометричного та потенціометричного біосенсорів на основі уреазини. Було показано, що додавання цеоліту Na^+ -Бета 30 в мембрану не призводило до покращення чутливості, в той час як додавання цеолітів NH_4^+ -Бета 30 та H^+ -Бета 30 в мембрану сприяло значному підвищенню чутливості до сечовини для обох типів біосенсорів. Крім того, було показано, що додавання цеолітів (Na^+ -Бета 30, NH_4^+ -Бета 30 та H^+ -Бета 30) в біомембрану сенсорів не змінює інші аналітичні характеристики біосенсорів.

В роботі було оптимізовано концентрацію цеоліту H^+ -Бета 30 в мембрані (перевірено концентрації від 0,5 % до 15 %). Як видно з отриманих результатів (рис. 2), оптимальна концентрація цеоліту для кондуктометричного біосенсора становила 7,5 %, а для потенціометричного – 15 %. Вміст більших концентрацій цеолітів в мембрані не перевірявся, оскільки через агрегацію часток висококонцентрованої суспензії цеолітів виникали складнощі в точності відтворення даної маніпуляції.

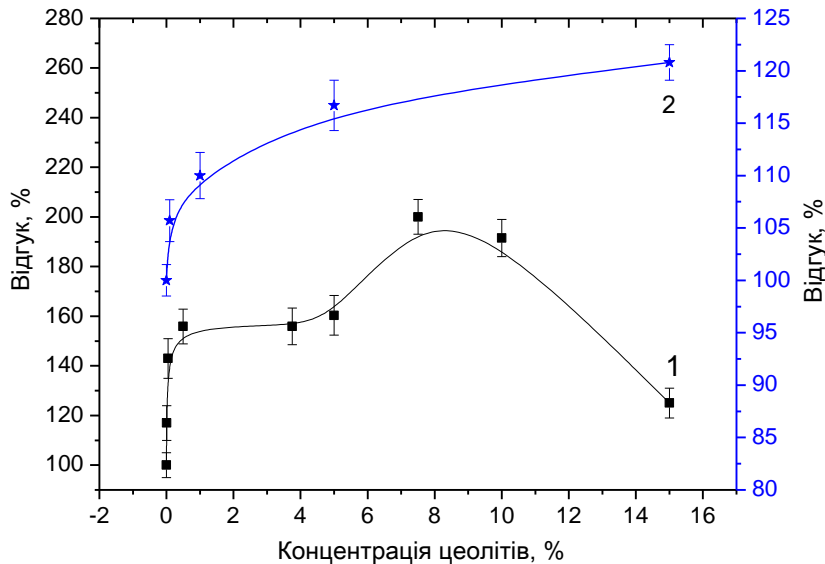


Рис. 2. Залежність відгуків кондуктометричних (1) та потенціометричних (2) біосенсорів від вихідної концентрації цеоліту H^+ -Бета 30

Підвищення чутливості біосенсорів, за присутності цеоліту H^+ -Бета-30 у ферментній мембрані, спостерігалось при одночасній іммобілізації ферменту у суміші з цеолітом (одношарова іммобілізація). Для підвищення позитивного ефекту було проведено двошарову іммобілізацію. Для цього використовували три варіанти конструювання біоселективних елементів. Перший варіант (1) полягав у нанесенні ферментної мембрани на поверхню перетворювача в якості першого шару та цеолітової мембрани в якості другого. Згідно другого варіанту іммобілізації (2), мембрани розміщувалися навпаки: спочатку цеолітова, а поверх неї ферментна. Третій варіант (3) базувався на нанесенні спочатку цеолітового шару, поверх якого наносили суміш фермент-цеоліт. Отримані дані (рис. 3) показали, що біосенсор, який містив у своєму складі цеоліт H^+ -Бета-30, іммобілізований відповідно до третього варіанту, мав набагато вищі відгуки на сечовину, ніж біосенсори на основі лише однієї іммобілізації уреазы без цеолітів.

Відомо, що гідрофобні властивості цеолітів зростають при збільшенні вмісту силіцію (замість алюмінію) в кристалічній ґратці. Цю властивість використовують при іммобілізації ферментів для забезпечення більш міцних гідрофобних взаємодій з ферментом. Встановлено, що використання цеолітів Бета зі збільшеним співвідношенням Si/Al (а отже гідрофобністю) призводить до збільшення на 50 % відгуків біосенсорів, порівняно з біосенсорами на основі цеолітів з меншим співвідношенням Si/Al у своєму складі. Втім, інші характеристики біосенсорів залишилися незмінними.

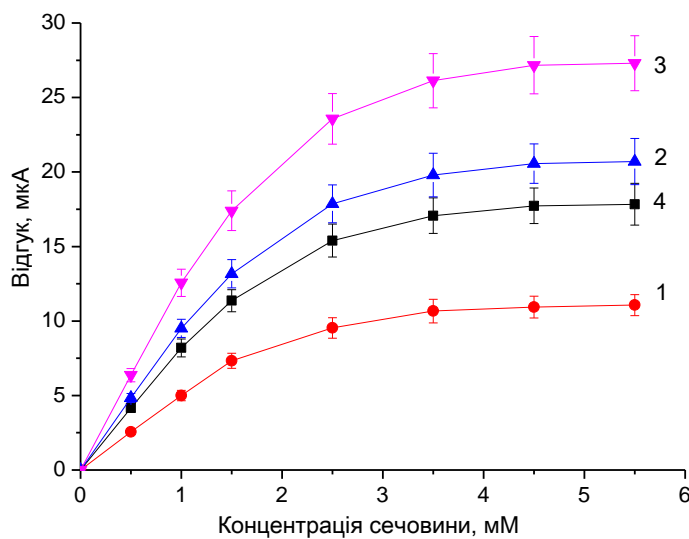


Рис. 3. Калібрувальні криві різних біосенсорів на основі уреазі. Біосенсори, основані на першому (1), другому (2), і третьому (3) варіанті ко-імобілізації уреазі з цеолітом Н⁺-Бета-30. Біосенсор на основі уреазі без цеолітів (4)

Перспективним напрямком розробки біосенсорів є використання при імобілізації методу адсорбції ферментів на цеолітах. В процесі роботи було модифіковано поверхню кондуктометричних золотих перетворювачів різними мікрота наночастинками цеолітів, і проведено адсорбцію уреазі на них. В якості адсорбентів було використано цеоліт нано-Бета, силікаліт, мезопористі кремнієві сфери, цеоліт L, цеоліт LTA-4, цеоліт A, цеоліт Бета-50 (рис. 4).

Найкращі результати було отримано для біосенсора на основі уреазі, адсорбованої на силікаліті, лінійний діапазон визначення сечовини становив від 5 до 850 мкМ, час відгуку – 3-4 хв, відтворюваність відгуків одного біосенсора – 4 %. Всі інші варіанти біосенсорів були цілком працездатними, проте більшість їхніх аналітичних характеристик були дуже близькими до характеристик біосенсорів на основі уреазі, імобілізованої в БСА мембрану за допомогою глутарового альдегіду (без цеолітів). Відтворюваність приготування біосенсорів, що оцінювалась як розбіжність між відгуками різних біосенсорів на одну й ту саму концентрацію субстрату, була значно кращою при адсорбції уреазі на цеолітах ніж при імобілізації в БСА мембрану за допомогою ГА.

Недоліком адсорбції, як методу імобілізації ферментів, вважається її нестійкість, через що фермент може поступово вимиватись у робочий розчин. Це, зазвичай, спричиняється слабкими зв'язками між адсорбентом та ферментом. Тому було перевірено стабільність уреазних біосенсорів протягом 10 днів зберігання. Біосенсори зберігали у холодильнику при температурі +4°C у сухому стані. За цей період відгуки біосенсорів зменшились на 10 %, що є гарним показником для ферментних біосенсорів і не гірше за результати, отримані при імобілізації уреазі іншими методами.

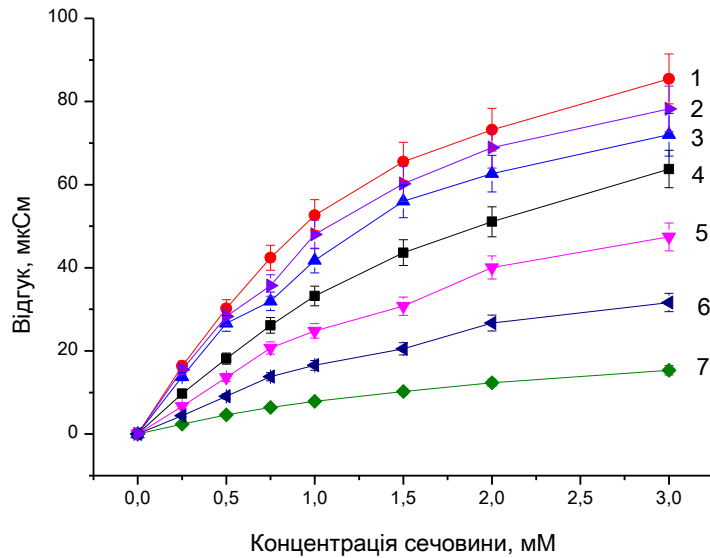


Рис. 4. Калібрувальні криві уреазних біосенсорів на основі різних типів цеолітів: силікаліт (1), наноцеоліт Бета (2), мезопористі кремнієві сфери (3), цеоліт LTA-4 (4), цеоліт А (5), цеоліт Бета-50 (6) та цеоліт L (7). Концентрація цеолітів в мембрані – 5 %

Оскільки при створенні біосенсорів шляхом адсорбції уреазини на силікаліті було отримано позитивні результати, було вирішено перевірити цю методику для створення біосенсорів на основі інших ферментів. Відповідно, проведено адсорбцію ряду ферментів (ГОД, АцХЕ, БуХЕ, РУ) на перетворювачі, модифіковані силікалітом. Отримані калібрувальні криві, що представлені на рис. 5, підтверджують широкі можливості методу адсорбції ферментів на цеолітах.

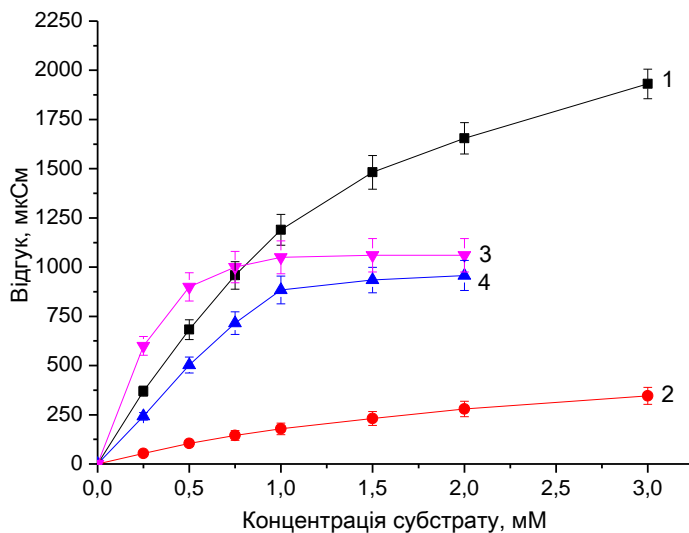


Рис. 5. Калібрувальні криві кондуктометричних біосенсорів на основі звичайної уреазини (1) та РУ (2), АцХЕ (3) та ГОД (4), адсорбованих на силікаліті

Єдиним біосенсором, характеристики якого були гіршими ніж для біосенсора на основі традиційного методу іммобілізації, був біосенсор для визначення бутирилхоліну на основі БуХЕ, адсорбованої на силікаліті, ймовірно, через погану здатність бутирилхолінестерази до адсорбції на даному носії.

Також, було перевірено можливість використання цеолітів для виготовлення амперометричних ферментних біосенсорів. Було розроблено біосенсор для визначення глутамату на основі глутаматоксидази та оптимізовано методику адсорбції ГлОД на цеоліті, з метою створення амперометричного біосенсора.

Кількість ферменту, що адсорбується на перетворювачі, залежить, в першу чергу, від кількості сорбенту (цеоліту). На товщину шару цеоліту може впливати як концентрація самого цеоліту, так і час формування цього шару. Тому процедуру нанесення 5 % цеоліту на перетворювач проводили за різного часу нагрівання в печі до 150 °С (від 10 до 960 секунд). Як видно з рис. 6, А, час формування шару цеоліту на поверхні платинового електроду має становити, щонайменше, 60-90 секунд. Також, було встановлено оптимальну концентрацію цеоліту для адсорбції саме ГлОД (рис. 6, Б). Нанесення 2,5 % цеоліту значно збільшувало активність біоселективного елемента у порівнянні з нанесенням 0,25 % цеоліту, однак подальше збільшення концентрації вже не давало значного ефекту.

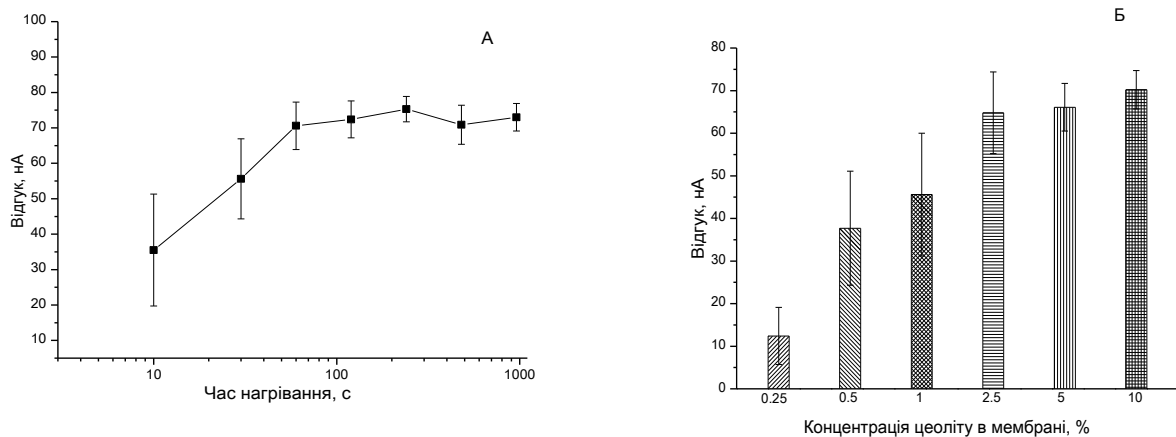


Рис. 6. Залежність величини відгуків біосенсора на основі ГлОД, адсорбованої на цеоліті, від часу нанесення цеоліту на перетворювач на основі платиновий диск (А) та концентрації цеоліту (Б). Концентрація глутамату – 1 мМ

Метою наступного етапу роботи було підібрати оптимальні умови адсорбції ГлОД на цеоліті. Виявилось, що в діапазоні часу адсорбції 2-30 хв, величина відгуків біосенсора була приблизно однаковою. Тому за оптимальний час було прийнято 5 хв, оскільки цього було достатньо для повного висихання краплі з ферментом, що наносилась на перетворювач. Більш значні ефекти були отримані при зміні концентрації ферменту в процесі формування мембрани. При збільшенні концентрації ферменту в біоселективній мембрані до 2 %, збільшувався і відгук біосенсора на глутамат. Подальше збільшення концентрації ферменту позитивно на відгук біосенсора вже не впливало.

Для роботи біосенсора дуже важливими є такі характеристики, як відтворюваність та операційна стабільність сигналу, тому ці характеристики були досліджені. Похибка відтворюваності сигналів біосенсора становила 5,7-6,9 %, в залежності від концентрації глутамату. Також було показано, що біосенсор характеризувався гарною операційною стабільністю протягом 4-х днів роботи.

Далі було перевірено можливість використання адсорбції ферментів при роботі з амперометричними планарними нікелевими електродами (рис. 7).

Через особливості будови перетворювачів, мікрочастинки були нанесені на проміжний шар з поліетиленіміну (дивись матеріали та методи). На модифіковані перетворювачі адсорбували глюкозооксидазу. Для порівняння використовували

біосенсор на основі ГОД, іммобілізованої в БСА мембрану, використовуючи пари ГА. Біосенсори на основі цеолітів мали чутливість більшу, ніж біосенсори на основі ГОД, іммобілізованої в парах ГА, що співпадає з результатами, отриманими для амперометричних біосенсорів на основі ГЛОД.

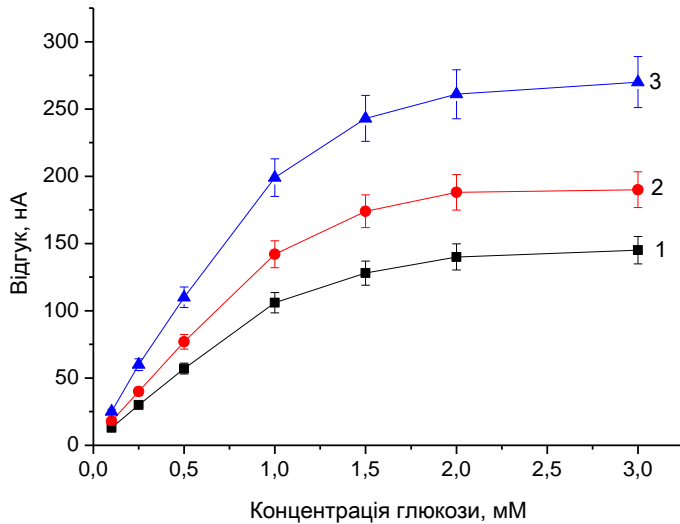


Рис. 7. Калібрувальні криві амперометричного біосенсора для визначення глюкози на основі глюкозооксидази, іммобілізованої в БСА мембрані за допомогою глутарового альдегіду (1), або адсорбованої на силікаліті (2) та наноцеоліті Бета (3)

На наступному етапі роботи було перевірено перспективність використання методу адсорбції ферментів на цеолітах для створення потенціометричних біосенсорів. Для ІСПТ було використано альтернативну методику нанесення цеолітів на поверхню перетворювача, яка була використана для нікелевих амперометричних перетворювачів. На модифіковані шаром цеоліту перетворювачі адсорбували уреазу. Результати, як завжди, порівнювались з біосенсорами на основі ферменту, іммобілізованого в парах ГА. Порівняльні дані для біосенсорів на основі різних типів іммобілізації представлені в табл. 1. Отримані дані показують, що адсорбція на цеолітах може сприяти покращенню чутливості, зменшенню похибки відтворюваності сигналу та часу відгуку.

На останньому етапі роботи було показано, що кондуктометричний біосенсор на основі уреазу, адсорбованої на силікаліті, був успішно використаний для визначення концентрацій сечовини у зразках сироватки крові здорових та хворих на ниркову недостатність людей. Результати, отримані біосенсорним методом були підтверджені шляхом визначення сечовини у тих самих зразках із використанням традиційного спектрофотометричного методу – діацетилмоноксимної реакції (табл. 2). Кореляція результатів, отриманих двома методами була високою ($R=0,995$).

Таким чином, методика адсорбції ферментів на цеолітах дозволяє, з одного боку, уникати використання токсичних речовин (ГА та ін.) при іммобілізації, а з іншого отримувати біосенсори з покращеними аналітичними характеристиками. Ефективне використання біосенсорів для аналізу реальних зразків, а також висока кореляція біосенсорних результатів з традиційними методами аналізу, свідчать про перспективність розроблених біосенсорів для впровадження та практичного використання.

Таблиця 1

Порівняння аналітичних характеристик біосенсорів, розроблених з використанням різних типів іммобілізації уреаз

Параметр	Тип іммобілізації		
	в парах ГА	адсорбція на силікаліті	адсорбція на наноцеоліті Бета
Границя визначення, мМ	0,005	0,0015	0,0015
Похибка відтворюваності сигналу, %	9,6	4,7	3,4
Похибка відтворюваності приготування біосенсорів, %	25,5	17,4	17,8
Лінійний діапазон роботи, мМ	0-1,5	0-1,5	0-1,0
Час відгуку, с	120	30	55

Таблиця 2

Результати аналізу концентрацій сечовини у зразках сироватки крові людей з використанням традиційного та біосенсорного методів

№ зразку сироватки крові	Метод аналізу сечовини	
	Біосенсор, мМ	Традиційний метод, мМ
1	28,9 ± 3,7	27,2 ± 2,5
2	39,8 ± 3,3	42,0 ± 3,8
3	42,7 ± 2,6	36,7 ± 3,1
4	57,2 ± 6,1	47,4 ± 4,1
5	37,9 ± 5,6	33,1 ± 3,5
6	5,9 ± 1	5,6 ± 0,6
7	4,5 ± 1,1	4,4 ± 0,6

Покращення селективності амперометричного перетворювача за рахунок використання нанорозмірних *m*-фенілендіамінових плівок. Важливою аналітичною характеристикою біосенсорів є їхня селективність. Селективність біосенсора визначається двома складовими – селективністю біологічного матеріалу та селективністю перетворювача. Зазвичай, в електрохімічних біосенсорах використовують селективний біоматеріал (ферменти чи антитіла), але перетворювачем є електрод, який є відносно неселективним. В електрохімічних амперометричних біосенсорах проблемою є можливе окиснення або відновлення ряду різних електроактивних сполук (інтерферентів) на поверхні електроду, що призводить до похибок сигналу біосенсора. Основними інтерферентами в біологічних зразках є аскорбінова кислота, цистеїн, гомоцистеїн, сечова кислота, дофамін, глутатіон, та інші.

Існує два основних напрямки щодо запобігання окиснення інтерферуєчих речовин на електродній поверхні: зменшення робочого потенціалу за рахунок модифікації електроду, та нанесення додаткових напівпроникних мембран, які селективно пропускають до поверхні електроду цільову речовину (Cosnier and

Holzinger, 2011). Серед таких мембран значну увагу привертають полімерні плівки на основі фенілендіаміну (Stejskal et al., 2015). Такі мембрани утворюють пори, розмір яких є достатнім для проходження низькомолекулярних сполук, зокрема перекису водню, та недостатнім для проходження більших за розміром сполук (інтерферентів) до поверхні електрода. Відомі методики нанесення ПФД є досить складними, а іноді, навіть, суперечать одна іншій. Тому важливо було встановити, яка методика є найбільш перспективною для формування додаткових мембран на основі ПФД при створенні біосенсорів на основі платинових дискових електродів. Формування ПФД мембрани проводили шляхом електрополімеризації молекул мономера (*m*-фенілендіаміну) на поверхні платинового дискового електроду двома методами: при змінному потенціалі (циклічна вольтамперометрія) та при постійному потенціалі.

Для проведення циклічної вольтамперометрії робочі перетворювачі разом з електродом порівняння та допоміжним електродом розміщували в робочій комірці з розчином *m*-фенілендіаміну, після чого отримували певну кількість циклічних вольтамперограм (Killoran et al., 2008). Другий метод нанесення ПФД мембрани полягав в окисненні фенілендіаміну на поверхні платинових електродів при постійному потенціалі протягом певного часу (Soldatkin et al., 2009). Порівняння відгуків перетворювачів з мембранами, нанесеними обома методами, на пероксид водню та інтерферуєчі речовини наведено на Рис. 8. Оскільки відгуки на інтерференти були практично відсутні, це свідчить, що мембрана, нанесена обома методами, непогано затримувала інтерференти. Але, використання циклічної вольтамперометрії виявилось більш ефективним, як мінімум з трьох причин – менша кількість часу (15 хвилин проти 40 хв), більш ефективне затримання цистеїну та збільшена чутливість до H_2O_2 за рахунок електрохімічної активації платинового електроду.

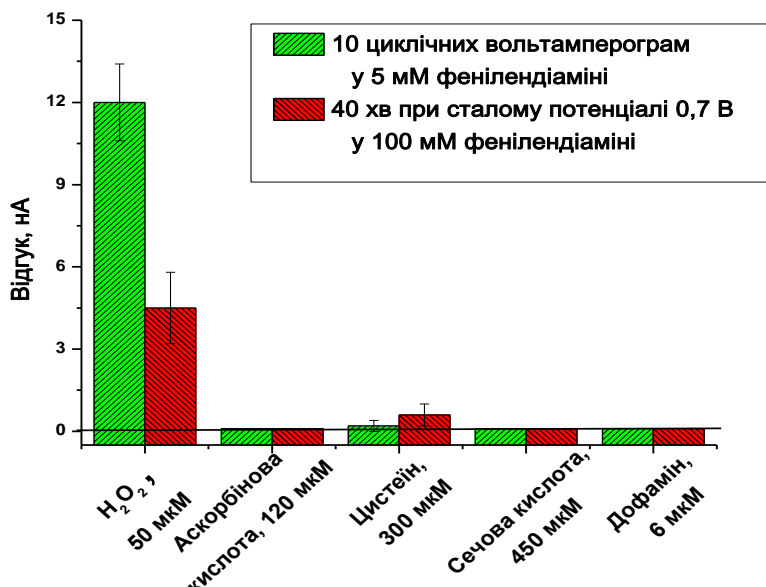


Рис. 8. Порівняння ефективності роботи ПФД мембран, нанесених при постійному та змінному потенціалі

Необхідно зазначити, що методика нанесення ПФД-мембрани з використанням циклічної вольтамперометрії все ж таки має недолік, а саме – неможливість одночасного отримання вольтамперограм на кількох амперометричних перетворювачах. Тому, подальша робота була зосереджена саме на оптимізації

методики нанесення ПФД мембран з використанням циклічної вольтамперометрії з метою скорочення часу нанесення напівпроникних мембран на перетворювачі. Підбір оптимальних умов нанесення ПФД мембрани на перетворювач було розпочато з вибору кількості циклічних вольтамперограм під час електрополімеризації. Спочатку було перевірено ефективність ПФД мембран, які наносили при різних кількостях циклічних вольтамперограм (рис. 9 А).

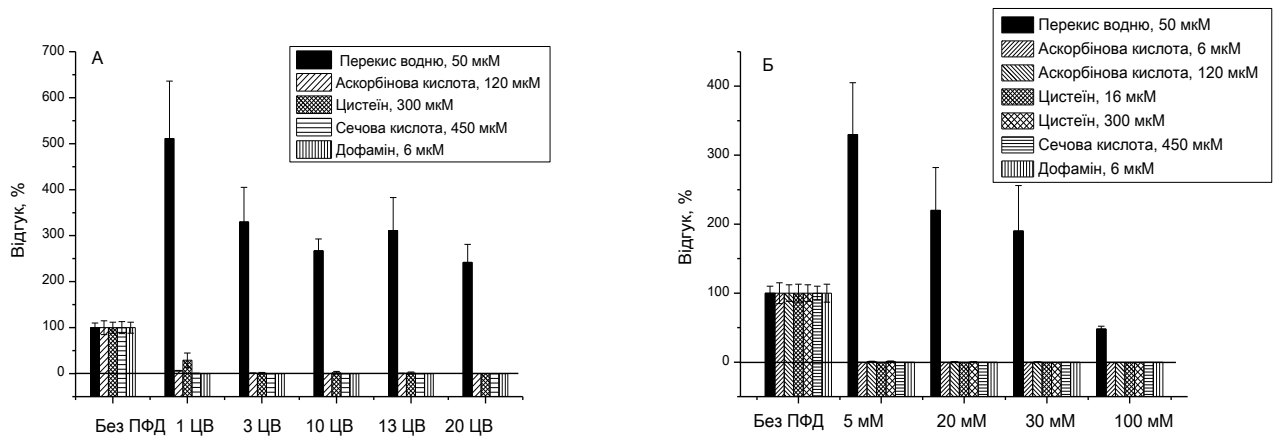


Рис. 9. Ефективність ПФД мембран, нанесених з використанням різної кількості циклічних вольтамперограм (А) та концентрації фенілендіаміну (Б).

Нанесення ПФД мембрани з використанням однієї вольтамперограми було, очевидно, недостатнім, проте ефект від електроактивації платини при цьому був найбільшим. Вже трьох циклічних вольтамперограм було достатньо для повного зникнення відгуків сенсора на сечову кислоту та дофамін і дуже суттєвого зменшення відгуків на аскорбінову кислоту та цистеїн. Тому було вирішено прийняти дану кількість вольтамперограм за оптимальну і збільшити концентрацію фенілендіаміну для повного усунення впливу інтерферентів (рис. 9, Б).

Як виявилось, збільшення концентрації *m*-фенілендіаміну до 20 мМ і проведення трьох ЦВА під час нанесення мембрани, було достатнім для отримання перетворювачів, які були не чутливі до цистеїну та мінімально чутливі до аскорбінової кислоти (0,1 % від відгуку на аскорбінову кислоту без ПФД мембрани). Оскільки тривалість однієї вольтамперограми складає близько 1,5 хв, для нанесення мембрани на один сенсор достатньо було 4,5 хвилини.

Для дослідження стабільності додаткових мембран, протягом двох годин, перетворювачі з нанесеною ПФД мембраною залишали в робочому буфері і періодично отримували відгуки на внесення електроактивних речовин (рис. 10). Було з'ясовано, що відгуки на перекис водню зростають протягом роботи, в той час як відгуки на інтерференти залишаються мінімальними і, навіть, зменшуються.

Було досліджено стабільність зберігання ПФД-мембрани. Встановлено, що протягом 8 днів чутливість сенсорів до перекису водню збільшилася в 2,5 рази, тоді як чутливість до аскорбінової кислоти та цистеїну залишалася незмінною. Цей ефект можна пояснити деяким повільним набуханням ПФД-мембрани, що призводить до поліпшення дифузії перексиду водню через шар ПФД.

В роботі перевірено ефективність ПФД мембрани шляхом аналізу реальних біологічних зразків. Перетворювачі без нанесеної додаткової мембрани давали певні відгуки на внесення зразків сироватки крові до робочої комірки. Проте, після нанесення ПФД мембрани, жодних відгуків не спостерігалось. Ці експерименти показують, що розроблений метод нанесення ПФД на платинові дискові електроди є ефективним, а модифіковані перетворювачі можна використовувати при створенні біосенсорів для роботи зі складними біологічними зразками.

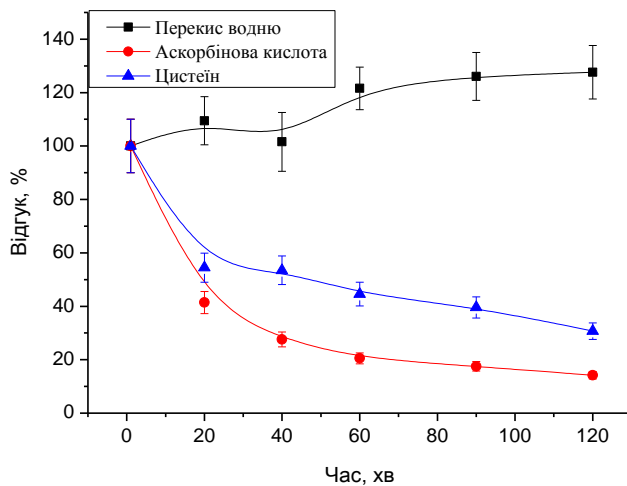


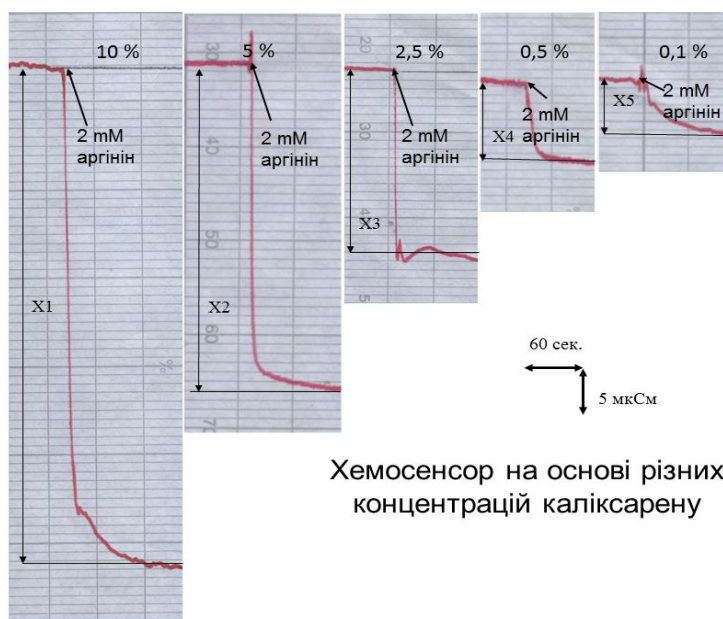
Рис.10. Стабільність ПФД мембрани впродовж двох годин. Відгуки на три речовини були нормалізовані до початкової відповіді на відповідну речовину після нанесення ПФД

Розробка хемосенсора на основі каліксарену для визначення аргініну.

Через здатність каліксаренів до різних взаємодій, мультисайтового водневого зв'язку, специфічної збірки і узагальнених електростатичних взаємодій, їх похідні можна використовувати в якості селективних елементів при розробці сенсорних систем. В роботі розроблено новий хемосенсор на основі каліксарену для кількісного визначення аргініну. В якості аналіту було обрано L-аргінін, оскільки ця речовина відіграє ключову роль у підтримці гомеостазу судин і функцій ендотелію. Крім того, він є маркером серцево-судинних захворювань, включаючи гіпертензію, ішемічну хворобу серця, дисфункцію периферичних і коронарних судин та атерому. Відповідно, розробка сенсора на основі каліксаренової мембрани для кількісного визначення аргініну є вельми актуальним завданням.

Перш за все, було визначено оптимальну кількість каліксарену на поверхні кондуктометричного перетворювача. Для цього було зроблено серію повторів процедури покриття датчика каліксареном з використанням його різних концентрацій (0,1 %, 0,5 %, 2,5 %, 5 % та 10 %). Подальше збільшення концентрації каліксарену було неможливим, оскільки при збільшенні його концентрації, нанесена крапля не розтікалась по поверхні перетворювача і не давала змоги чітко, та з точною відтворюваністю наносити його на чутливу поверхню. Було порівняно типові відгуки хемосенсорів на основі різних концентрацій каліксарену (рис. 11). Як видно з рисунку, хемосенсори із селективними мембранами, створеними з використанням розчинів 2,5 та 5 % каліксарену, продемонстрували час відгуку на аргінін приблизно 1 хв, що в 2,5 рази менше, порівняно з хемосенсором, створеним з використанням 10 % каліксарену. Відповідно, якщо є необхідність у зменшенні часу аналізу, необхідно

використовувати розчин 5 % каліксарену, а, при необхідності збільшення чутливості, 10 % каліксарену для створення мембрани сенсора.



Хемосенсор на основі різних концентрацій каліксарену

Рис. 11. Типові відгуки сенсорів з селективними мембранами, створеними з використанням різних концентрацій каліксарену, на внесення 2 мМ аргініну до робочої комірки.

В табл. 3 представлено порівняльні дані (базовий рівень шуму та дрейфу, мінімальна границя визначення, чутливість, лінійний діапазон, похибка відтворюваності сигналу) для хемосенсорів, створених з використанням різних концентрацій каліксарену.

Отримані дані показують, що шляхом зміни концентрації каліксарену у мембрані, можна контролювано змінювати аналітичні характеристики сенсора для визначення аргініну. В подальших експериментах було використано сенсор, виготовлений з використанням 10 % каліксарену, оскільки саме такий варіант сенсора забезпечував найкращу чутливість до низьких концентрацій аргініну.

Таблиця 3

Характеристики сенсорів на основі різних концентрацій каліксарену в мембрані

Аналітичні характеристики біосенсора	Концентрація каліксарену в мембрані				
	10%	5%	2,5%	0,5%	0,1%
Чутливість, мкСм/мМ	37,5	23,45	11,25	9,37	6,5
Мінімальна межа визначення, мМ	0,005	0,005	0,03	0,04	0,1
Лінійний діапазон вимірювання, мМ	5-150	5-150	50-150	100-300	150-600
Час відгуку, с	150	50	60	80	150
Шум базової лінії, мкСм	0,375	0,25	0,25	0,5	0,5
Дрейф базової лінії, мкСм/хв	0,0625	0,125	0,075	0,25	0,75
Похибка відтворюваності, %	2,5	1,7	3,9	2,7	4,8

Було перевірено селективність хемосенсора на основі каліксарену до низки амінокислот. Для цього було обрано амінокислоти, які утворюють найбільш стійкі комплекси з каліксареном. Коефіцієнт селективності до аргініну розраховувався як

співвідношення реакції хемосенсора на аргінін (v1) та іншої амінокислоти (v2) ($S = v1 / v2$). Результати досліджень приведені в табл.4.

Таблиця 4

Чутливість хемосенсора на основі каліксарена до амінокислот

Тип амінокислоти	Аміно-кислоти	Відгук хемосенсора, мкСм	*Відгук хемосенсора, %	S
Неполярні	Іле	4,25	4,8	20,6
	Лей	5	5,7	17,5
Полярні негативно заряджені	Асп	5,1	5,8	17,2
	Глу	1,4	1,6	62,5
Полярні позитивно заряджені	Гіс	78,1	89,3	1,1
	Ліз	44,4	50,7	2,0
	Арг	87,5	100	-
Ароматичні	Три	13,1	15	6,7

* Відгук сенсора на 2 мМ аргінін приймали, як 100%.

Як видно з табл. 4, хемосенсор характеризувався високою селективністю до неполярних, полярних негативно заряджених і ароматичних амінокислот. Але, на жаль, хемосенсор проявляв високу чутливість і до полярних позитивно заряджених амінокислот, що може стати на заваді при його використанні для аналізу реальних біологічних зразків.

Далі було порівняно аналітичні характеристики розробленого хемосенсора та біосенсора на основі двох ферментів (уреази та аргінази). В ході ферментативних реакцій збільшується концентрація іонів у робочій мембрані, відповідно змінюється провідність. Величина зміни провідності є пропорційною до концентрації аргініну.

Перш за все, необхідно було провести оптимізацію основних параметрів іммобілізації, тобто потрібно було підібрати оптимальні концентрації обох ферментів та ГА, час інкубації та визначити послідовність процедури іммобілізації. Було встановлено, що оптимальна концентрація кожного з ферментів в біоселективній мембрані становить 5 %. Найбільш ефективними є використання під час іммобілізації концентрації глутарового альдегіду від 0,1 % до 0,5 %, а оптимальна тривалість іммобілізації з використанням глутарового альдегіду становить 30 хв.

Також було вивчено інші параметри розробленого двоферментного біосенсора. Межа біосенсорного визначення аргініну становила 2,5 мкМ (вона визначалась як концентрація аргініну, величина відгуку на яку втричі перевищує шум базової лінії). Лінійний діапазон роботи становив від 2,5 мкМ до 500 мкМ, чутливість до аргініну складала $13,4 \pm 2,4$ мкСм/мМ. Для дослідження селективності розробленого ферментного біосенсора було вивчено вплив інших амінокислот на його роботу. Слід зазначити, що визначення аргініну, в значній мірі, залежало від складу біоселективного елементу біосенсора та параметрів робочого буферного розчину. Змінюючи ці параметри, можна досягти необхідних аналітичних характеристик

біосенсора в залежності від поставлених задач. Результати порівняння аналітичних характеристик біо- та хемосенсора наведено у табл. 5.

Таблиця 5

Аналітичні характеристики біосенсора та хемосенсора для визначення аргініну

Селективний матеріал	Аргіназа + Уреаза	Каліксарен
Чутливість, мкСм×мм ⁻¹	13,4±2,4	37,5
Час відгуку, с	20	50
Лінійний діапазон, мМ	0,0025 - 0,5	0,03 - 2
Похибка аналізу, %	5	2,5
Специфічність до субстрату, %*	Арг- 100, Мет-3, Глн-4, Ала-2, Цис-17, Гіс-14, Глі-4, Ліз-12, Тир-5, Лей-3, Вал-2, Асн-6, Сер-3, Іле-3, Асп-10, Глу-9, Тре-3, Про-3, Три-0.	Арг – 100; Іле – 4,8; Лей – 5,7; Асп – 5,8; Глу – 1,6; Гіс – 89,3; Ліз – 50,7; Три – 15.

* Відгук сенсора на 2 мМ аргінін приймали, як 100%.

Виявилось, що ферментний біосенсор характеризувався кращою селективністю до аргініну та швидшим відгуком, порівняно з хемосенсором. В свою чергу, каліксареновий хемосенсор мав більшу чутливість та меншу похибку вимірювання. Лінійний діапазон роботи був різний в обох сенсорах. Встановлено, що кожен з цих сенсорів має свої переваги та недоліки. В залежності від сфер подальшого застосування, можна використовувати або хемосенсор на основі каліксарену, або ферментний біосенсор.

Таким чином, в дисертаційній роботі запропоновано кілька методик виготовлення біосенсорів із використанням мікро та нанорозмірних матеріалів, одна з яких – виготовлення ферментних біосенсорів з використанням цеолітів. Також в роботі розроблено методику покращення селективності амперометричного перетворювача за рахунок нанесення додаткової фенілєндіамінової мембрани. Окрім цього, в роботі представлено схему розробки хемосенсора на основі каліксаренової мембрани для визначення аргініну. Згідно цих методик, створено діючі лабораторні прототиби сенсорів та показано можливість їх застосування при аналізі реальних зразків.

ВИСНОВКИ

Розроблено нові біотехнологічні підходи використання мікро- та наноматеріалів (цеоліти різної природи, каліксарени, полі-*m*-фенілєндіамінові плівки) для покращення основних аналітичних характеристик електрохімічних біо- та хемосенсорів, таких як лінійний діапазон роботи, чутливість, мінімальна границя визначення, похибка вимірювань, відтворюваність виготовлення, стабільність тощо.

1. Розроблено нові методи створення біоселективних елементів з використанням коїмобілізації ферментів з різними цеолітами в парах глутарового

альдегіду. Показано, що використання методу формування біоселективної мембрани біосенсора з використанням коїмобілізації уреазі з цеолітами різних модифікацій призводить до покращення чутливості електрохімічних біосенсорів щонайменше в 2,5 рази.

2. Доведено, що застосування нового методу адсорбції на цеолітах призводить до покращення майже всіх аналітичних характеристик біосенсорів на основі різних ферментів:

- Ацетилхолінестераза: мінімальна границя визначення ацетилхоліну – 0,5 мкМ; чутливість – 1800 мкСм/мМ; лінійний діапазон роботи – 0,002-0,4 мМ.
- Уреаза: мінімальна границя визначення сечовини – 1,5 мкМ; чутливість – 1480 мкСм/мМ; лінійний діапазон роботи – 0,01-1 мМ.
- Глюкозооксидаза: мінімальна границя визначення глюкози – 1,5 мкМ; чутливість – 884 мкСм/мМ; лінійний діапазон роботи – 0,005-1 мМ.
- Рекомбинантна уреазі: мінімальна границя визначення сечовини – 25 мкМ; чутливість – 178 мкСм/мМ; лінійний діапазон роботи – 0,1- 7,5 мМ.
- Глутаматоксидаза: мінімальна границя визначення глутамату – 0,5 мкМ; чутливість – 0,5 мкА/мМ; лінійний діапазон роботи – 2,5-400 мкМ.

3. Оптимізовано методику формування додаткової напівпроникної мембрани на основі поліфенілендіаміну (3 циклічні вольтамперограми протягом 4,5 хвилини у 20 мМ розчині *m*-фенілендіаміну) для покращення селективності амперометричного перетворювача. Така мембрана може використовуватись, щонайменше, протягом 2 годин безперервної роботи і зберігатися не менше 8 діб. З використанням запропонованої ПФД мембрани чутливість перетворювача до електроактивних речовин зменшувалась майже на 100 %.

4. Розроблено новий кондуктометричний хемосенсор на основі каліксарену (ди-(3-метилсульфідпропокси) калікс[4]арен метиленбісфосфо-нова кислота) для визначення аргініну, досліджено його аналітичні характеристики (шум базової лінії – 0,375 мкСм; дрейф базової лінії – 0,062 мкСм/хв.; мінімальна границя визначення – 5 мкМ; чутливість – 37,5 мкСм/мМ; лінійний діапазон роботи – 5-150 мкМ), які порівняно з параметрами двоферментного біосенсора на основі уреазі та аргінази.

5. Створено лабораторні прототипи електрохімічних сенсорів на основі запропонованих методів формування біо(хемо)селективних елементів з використанням мікро- і нанорозмірних матеріалів, досліджено їхні аналітичні характеристики, та продемонстровано можливість їхньої роботи з реальними зразками.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Soldatkina OV, Soldatkin OO, Kasap BO, Kucherenko D, Kucherenko I, Akata B, Dzyadevych S.** Novel amperometric glutamate biosensor based on glutamate oxidase adsorbed on silicalite. *Nanoscale Research Letters*. 2017;12(260):1-8. *(Особистий внесок здобувача: розробка амперометричного біосенсора для визначення глутамату з використанням адсорбції глутаматоксидази на силікаліті)*

2. **Soldatkina OV**, Kucherenko IS, Pyeshkova VM, Alekseev SA, Soldatkin OO, Dzyadevych SV. Improvement of amperometric transducer selectivity using nanosized phenylenediamine films. *Nanoscale Research Letters*. 2017;12(1):594. *(Особистий внесок здобувача: дослідження умов нанесення напівпроникної мембрани на основі поліфенілендіаміну для зменшення впливу інтерферуючих речовин на роботу сенсорів)*
3. Кучеренко ІС, **Солдаткіна ОВ**, Кучеренко ДЮ, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ. Адаптація процедури нанесення поліфенілендіамінової мембрани на дискові платинові перетворювачі. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2017;14(1):48-57. *(Особистий внесок здобувача: оптимізація процедури нанесення та складу додаткової поліфенілендіамінової мембрани на амперометричні перетворювачі)*
4. **Soldatkina OV**, Kucherenko IS, Soldatkin OO, Pyeshkova VM, Dudchenko OY, Akata Kurç B, Dzyadevych SV. Development of electrochemical biosensors with various types of zeolites *Applied Nanoscience Int.*2018.doi: 10.1007/s13204-018-0725-9. *(Особистий внесок здобувача: використання цеолітів при виготовленні трьох типів електрохімічних ферментних біосенсорів)*
5. Soldatkin OO, Marchenko SV, **Soldatkina OV**, Cherenok SO, Kalchenko OI, Prynova OS, Sylenko OM, Kalchenko VI, Dzyadevych SV. Conductometric sensor with calixarene-based chemosensitive element for arginine detection. *Chemical Papers* 2018; 72(11):2687–97. *(Особистий внесок здобувача: створення та оптимізація роботи сенсора на основі каліксарена для визначення аргініну)*
6. **Soldatkina OV**, Soldatkin OO, Velychko TP, Prilipko VO, Kuibia MA, Dzyadevych SV. Conductometric biosensor for arginine determination in pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry*. 2018;124:40-46. *(Особистий внесок здобувача: розробка біосенсора на основі коїмобілізованих уреаз та аргінази)*
7. **Солдаткіна ОВ**, Марченко СВ, Кучеренко ІС, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ, Черенок СО, Пріньова ОС, винахідники; Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, патентовласник. Кондуктометричний сенсор на основі каліксарену для кількісного аналізу аргініну в водних розчинах. Патент України № 129983. 2018 Лис 26. *(Особистий внесок здобувача: розробка хемосенсора на основі каліксаренової мембрани)*
8. **Soldatkina OV**, Ozansoy Kasap B, Akata Kurc B, Dzyadevych SV. Zeolite as a perspective material for amperometric biosensor creation. IV Международная научно-практическая интернет-конференция. Актуальные научные исследования в современном мире; 2015, авг.21-22; Переяслав-Хмельницкий. Переяслав-Хмельницкий: Переяслав-Хмельницкий государственный педагогический университет имени Григория Сковороды; 2015, с. 3-4.
9. Kucherenko IS, **Soldatkina OV**, Akata B, Dzyadevych SV. Biosensor based on urease, adsorbed on silicalite. IV Международная научно-практическая интернет-конференция. Актуальные научные исследования в современном мире; 2015, авг.21-22; Переяслав-Хмельницкий. Переяслав-Хмельницкий: Переяслав-Хмельницкий государственный педагогический университет имени Григория Сковороды; 2015, с. 4-5.

10. **Солдаткіна ОВ**, Кучеренко ДЮ, Кучеренко ІС, Дзядевич СВ. Біосенсор на основі уреазі адсорбованої на силікаліті для визначення сечовини. 5-а Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії»; 2016 трав. 12-13; Київ. Київ: Компринт; 2016, с. 123-124.
11. Soldatkin OO, Kasap BO, **Soldatkina OV**, Kucherenko D, Kucherenko I, Akata B, Dzyadevych S. A novel amperometric glutamate biosensor based on glutamate oxidase adsorbed on silicalite. International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2016), 2016 Aug 24-27; Lviv. Lviv: Eurosvit; 2016, p. 503.
12. Soldatkin OO, Kucherenko IS, **Soldatkina OV**, Dzyadevych SV. Analysis of using various modifications of zeolites in electrochemical biosensors. International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2017), 2017 Aug 23-26; Chernivtsi. Kyiv: SME Burlaka, 2017, p. 659.
13. Soldatkin OO, Marchenko SV, **Soldatkina OV**, Kalchenko VI, Kalchenko OI, Cherenok SO, Prynova OS, Dzyadevych SV. Calixarene-based sensor for the arginine determination. 8-а Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (СЕМСТ-8), 2018 трав. 28-черв. 01; Одеса. Одеса: Астропринт, 2018, с. 119.
14. Kucherenko IS, Soldatkin OO, Marchenko SV, **Soldatkina OV**, Prilipko VO, Kuibida MA, Cherenok SO, Prynova OS, Sylenko O.M, Kalchenko OI, Kalchenko VI, Dzyadevych SV. Comparison of the possibility of using a calixarene based sensor and a two enzymes based biosensor for the arginine analysis. International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (NANO-2018), 2018 Aug 27-30; Kyiv: SME Burlaka, 2018, p. 66.

АНОТАЦІЯ

Солдаткіна О.В. Використання нано- та мікророзмірних матеріалів для розробки електрохімічних сенсорів з покращеними аналітичними характеристиками - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Державна установа «Інститут харчової біотехнології та геноміки Національної академії наук України», Київ, 2019.

Дисертація присвячена дослідженню можливостей використання мікро- та наноматеріалів з метою розробки нових та вдосконалення вже існуючих електрохімічних сенсорів.

Показано можливість використання цеолітів у складі електрохімічних ферментних біосенсорів, що застосовуються для прямого визначення субстратів та запропоновано новий метод іммобілізації біологічного матеріалу – адсорбцію ферментів на електрохімічних перетворювачів, модифікованих шаром цеолітів.

Оптимізовано методику нанесення ПФД мембрани на дискові платинові електроди з метою покращення селективності амперометричного перетворювача. Показано, що перетворювач з нанесеною ПФД мембраною не проявляє чутливості до

низки електроактивних речовин, чим значно підвищує точність біосенсорного аналізу при роботі з біологічними рідинами.

Розроблено кондуктометричний хемосенсор для селективного визначення аргініну на основі каліксаренової мембрани. Досліджено його основні аналітичні характеристики, які порівняно з параметрами двоферментного біосенсора. Показано, що кожен з сенсорів може використовуватись для напівселективного визначення аргініну, а також в якості елемента мультисенсора для визначення амінокислот.

Створено діючі лабораторні прототипи електрохімічних сенсорів з використанням мікро- і нанорозмірних матеріалів та продемонстровано можливість їхньої роботи з реальними зразками.

Ключові слова: наноматеріали, амперометрія, кондуктометрія, потенціометрія, біосенсор, хемосенсор, фермент, *m*-фенілендіамін, цеоліт, каліксарен, наночастинка.

АННОТАЦІЯ

Солдаткина О.В. Использование нано- и микроразмерных материалов для разработки электрохимических сенсоров с улучшенными аналитическими характеристиками. – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Государственное учреждение «Институт пищевой биотехнологии и геномики Национальной академии наук Украины», Киев, 2019.

Диссертация посвящена исследованиям возможности использования микро- и наноматериалов с целью разработки новых и усовершенствования существующих электрохимических сенсоров.

В работе показана возможность использования цеолитов в составе электрохимических ферментных биосенсоров, используемых для прямого определения субстратов, и предложено новый метод иммобилизации биологического материала – адсорбцию ферментов на электрохимических преобразователях, модифицированных цеолитами.

Оптимизировано методику нанесения ПФД мембраны на дисковые платиновые электроды с целью улучшения селективности амперометрического преобразователя. Показано, что за счет нанесенной на поверхность ПФД мембраны, биосенсор не проявляет чувствительности к ряду электроактивных веществ, чем значительно увеличивает точность биосенсорного анализа при работе с образцами биологических жидкостей.

В работе разработано кондуктометрический хемосенсор для селективного определения аргинина на основе каліксаренової мембрани, описано его основные аналитические характеристики и проведено их сравнение с параметрами двухферментного биосенсора. Показана возможность использования каждого из этих сенсоров для полуселективного определения аргинина, а также в качестве элемента мультисенсора для определения амінокислот.

Изготовлены действующие лабораторные прототипы электрохимических сенсоров на основе микро- и наноразмерных материалов и продемонстрирована возможность их работы с реальными образцами.

Ключевые слова: наноматериалы, амперометрия, кондуктометрия, потенциометрия, биосенсор, хемосенсор, фермент, *m*-фенилендиамин, цеолит, каликсарен, наночастичка.

SUMMARY

Soldatkina O.V. Application of nano- and microscaled materials for the development of electrochemical sensors with improved analytical characteristics. – Manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Biological Sciences on a speciality 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The development of biosensors is one of the current trends in analytical biotechnology. Important advantages of biosensor methods are high sensitivity and selectivity, ease of use and low cost of analysis. Today, a very promising tendency in the development of biosensor technologies is the usage of new micro- and nano-sized materials. Due to unique physical and chemical properties, these materials can be used for the regulated improvement of basic working characteristics of biosensors. Therefore, this thesis is devoted to studying the possibility of using some micro- and nanomaterials to create new and upgrade existing electrochemical biosensors.

One of the promising materials for modifying biosensors are zeolites. They attract the attention of researchers due to a number of unique properties. They are low toxic, chemically, mechanically and thermally stable, resistant to microbial degradation. The synthesis of zeolite allows the regulation of their characteristics. It is possible to change the Si/Al ratio, the charge and hydrophobicity of the material, the number and size of pores; the metal atoms can be built into the crystal lattice and held there by the coordination bonds.

In the work, different variants of the creation of enzyme biosensors using zeolites were investigated; the obtained results were compared with the biosensors based on the enzyme immobilization by the traditional method of cross-linking with glutaraldehyde. The first option was the coimmobilization of enzymes with zeolites in the bioelement of biosensor. The effect of various modifications of zeolite on the sensor characteristics was evaluated; some improvement in the sensitivity was observed. The second option of using zeolites in the biosensor development, the enzyme adsorption on the electrochemical transducers covered with a zeolite layer, appeared to be much more promising. It was demonstrated a possibility of using zeolites as adsorbents of various enzymes in the creation of biosensors based on three different types of transducers – conductometric, amperometric and potentiometric.

A new immobilization method based on the enzyme adsorption on zeolites was shown to improve such biosensor characteristics as sensitivity to the substrate, speed of analysis, reproducibility, operational stability, linear range of work, etc. Noteworthy, in the

biosensors manufacture the method of enzymes adsorption on zeolites is advantageous by a simple and fast procedure, good reproducibility, no need for toxic compounds. It is particularly important for the biosensor standardizing and mass production.

One of the most important analytical characteristics of any biosensor is its selectivity, an ability to detect the target substrate with no response to other substances. In electrochemical amperometric biosensors, a significant challenge is the oxidation or reduction of electrically active compounds on the electrode surface, which can be a cause of wrong results of biosensor measurement. It was found that the effect of interfering substances on the sensor operation can be almost completely eliminated by using three cyclic voltammograms in 20 mM *m*-phenylenediamine solution. It was also shown that such polyphenylenediamine membrane can be used over not less than two-hour continuous operation, and stored over not less than 8 days. Noteworthy, the transducer almost does not lose its sensitivity to hydrogen peroxide. Additional advantages are high rate and efficiency of the proposed procedure of PPD-membrane deposition compared with the existing techniques. The amperometric transducer with a PPD-membrane deposited on its surface was shown to be insensitive to the electroactive substances present in biological samples (ascorbic acid, cysteine, uric acid and dopamine); thus, it can be successfully used for the development of amperometric biosensors.

A new conductometric chemosensor for the determination of arginine based on a calixarene membrane was developed and investigated. The optimal calixarene concentration in the selective membrane was determined. High reproducibility of the sensor signals was shown, an error of measurement was 2.5%. Key working characteristics of the developed chemosensor (baseline noise and drift, minimum detection limit, sensitivity, linear range of work) were analyzed. The formation of a calixarene-arginine complex was studied and compared with the calixarene complexation with other amino acids; the sensor selectivity regarding other amino acids was estimated.

The developed chemosensor was compared with the bienzyme conductometric biosensor based on urease and arginase by their analytical parameters. It was shown that either the calixarene-based chemosensor or the bienzyme biosensor can be used depending on the needs and scope of further application. Each of them is appropriate for semiselective determination of arginine and as an element of the multisensor for the amino acids analysis.

Based on all the methods proposed for the formation of bio(chemo)selective elements using micro- and nanosized materials, the laboratory prototypes of electrochemical sensors were created; their analytical characteristics were studied; the possibility to analyze real samples was demonstrated.

Key words: nanomaterials, amperometry, conductometry, potentiometry, biosensor, chemosensor, enzyme, *m*-phenylenediamine, zeolite, calixarene, nanoparticle.