

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

СОЛДАТКІН Олександр Олександрович

УДК 543.555+577.15+543.553

**ОСНОВИ СТВОРЕННЯ МУЛЬТИФЕРМЕНТНИХ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ
БІОСЕНСОРІВ**

03.00.20 – біотехнологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

доктора біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та на кафедрі молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка (м. Київ).

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Дзядевич Сергій Вікторович
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
заступник директора з наукової роботи.

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

доктор біологічних наук, професор
Пирог Тетяна Павлівна
Національний університет харчових технологій,
завідувач кафедри біотехнології мікробного синтезу

доктор біологічних наук, професор
Колибо Денис Володимирович
Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України,
головний науковий співробітник відділу молекулярної
імунології

Захист відбудеться «___» листопада 2019 р. о __ год. на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 150).

Автореферат розіслано «___» жовтня 2019 року.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук, с.н.с.



І.В. Крупська

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Прогрес науки нерозривно пов'язаний з прогресом її методів. З цієї точки зору вітається розробка кожного нового методу аналізу чи появи різновиду уже відомого, який має кращі показники. Тому дуже цікавим і важливим напрямком досліджень є розробка біосенсорів для визначення широкого спектру різноманітних сполук. Значний інтерес, який проявляється до біосенсорів протягом останніх тридцяти років, зумовлений їхніми певними перевагами у порівнянні з традиційними методами та приладами біохімічного аналізу: відносній дешевизні та простоті використання при високій чутливості та специфічності, можливості роботи з забарвленими зразками тощо. Такі прилади можуть застосовуватись в медичній діагностиці, охороні навколишнього середовища, моніторинзі якості продуктів харчування, в сільському господарстві та контролі перебігу біотехнологічних процесів на виробництві.

Найбільш розповсюдженими варіантами біосенсорів є електрохімічні біосенсори на основі іммобілізованих ферментів. Поширеність ферментних електрохімічних біосенсорів пояснюється їхньою досить низькою вартістю, простою процедурою аналізу, здатністю до мініатюризації та, за необхідності, можливістю використання в польових умовах (Couto et al., 2016). Використання при розробці біосенсорів саме ферментів пояснюється швидкістю реакцій, високою селективністю та відносною стабільністю іммобілізованих ферментів. Крім того, наявність на ринку цілої низки комерційних очищених препаратів ферментів дає змогу розробляти біосенсори для аналізу різноманітних сполук. Відповідно, розробка електрохімічних біосенсорів на основі ферментів, на даний момент, проводиться дуже інтенсивно (Das et al., 2016).

На жаль, не всі ферменти можуть бути використані для створення електрохімічних біосенсорів, оскільки часто в ході ферментативних реакцій не продукуються речовини (наприклад, електрохімічно активні), що реєструються електрохімічними перетворювачами. Відповідно, значна частина ферментативних реакцій не може бути прямо зареєстрована. По цій причині обмежується і коло сполук, які можна визначати за допомогою ферментних електрохімічних біосенсорів. Дана проблема вирішується за рахунок розробки біосенсорів на основі кількох ферментів. Найбільш розповсюдженим варіантом є використання додаткових ферментів для каталізу реакцій розкладання складних сполук до більш простих, які далі розщеплюються за допомогою інших ферментів до продуктів, що можна реєструвати. Окрім розширення спектру речовин, що можна визначати, часто мультиферментні системи в біосенсоріці використовуються для покращення аналітичних характеристик біосенсорів, таких як чутливість, стабільність, лінійний діапазон роботи, селективність та інші. Ще однією перевагою використання кількох ферментів в складі біоселективного елементу біосенсора - є уникнення ефектів інгібування ферментів їхніми первинними продуктами реакцій. Під час роботи біоселективного елементу мультиферментного біосенсора, продукт одного ферменту одразу ж використовується іншим ферментом, що приводить до безперервного протікання реакцій.

На даний момент в біосенсоріці можна використовувати декілька варіантів поєднання кількох ферментативних реакцій, а саме - послідовні (каскадні), циклічні, конкурентні або незалежні реакції. Кожен варіант має як свої переваги, так і недоліки, тому дуже важливим є дослідити та проаналізувати перспективність використання таких мультиферментних систем у біосенсорах. Таким чином, розробка нових та вдосконалення існуючих підходів використання мультиферментних систем при розробці електрохімічних біосенсорів є вельми актуальним напрямом біосенсоріки.

Дисертаційна робота виконувалась на кафедрі молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка та у відділі біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України в рамках проектів: НДР № 16БФ07-03 «Комп'ютерне моделювання та експериментальні дослідження біологічних нанокондитивних комплексів», НДР № 2.2.4.22 «Електрохімічні мультибіосенсиори та сенсорні масиви: фундаментальні основи створення та функціонування», NATO Science for peace and security programme № СВР.NUKR.CLG984221 «Development of biosensors for botulinum neurotoxin determination with applicability to screening foods against biological terrorist attacks», УНТЦ № 6177 «Використання функціональних наноматеріалів для створення біосенсорних кондуктометричних приладів для визначення аргініну», УНТЦ № 6052 «Ферментна мультибіосенсорна система для діагностики ниркової дисфункції та контролю процедури гемодіалізу», УНТЦ № 4591 «Development of enzyme multisensor arrays for ecological monitoring of toxins», білатерального проекту Україна-Індія № М/384-2012 «Developing Electrochemical and Photochemical Biosensors using Chloroplast and Enzymatic Membranes», FP7-PEOPLE-IRSES-2008 проекту «Nanosensors based on nanomaterials» № 230802, FP7-PEOPLE-IRSES-2012 проекту «Integrated nanomaterials and nanodevices» № 318524, державним замовленням «Розроблення ферментного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів для визначення сечовини та креатиніну у медичній діагностиці» № ДЗ/45- 2015, державним замовленням «Розроблення портативної біосенсорної системи для експрес-діагностики інфаркту міокарда та інших захворювань» № ДЗ/25-2017, в рамках Програми «EUREKA» «Multiple biosensor device for monitoring of hemodialysis patients (HemoSensor)», № E!8835.

Мета і завдання. Мета дисертаційної роботи полягала в розробці фундаментальних та технологічних основ створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів для практичного застосування в різних галузях людської життєдіяльності.

Для досягнення вказаної мети було поставлено ряд завдань:

1. Обґрунтувати та розробити методичні підходи тестування електрохімічних перетворювачів та підібрати оптимальні схеми електрохімічного аналізу з метою покращення ефективності функціонування сенсорів.
2. Розробити мультиферментні біосенсиори на основі варіантів різних каскадів ферментативних реакцій та дослідити переваги та недоліки даного типу біосенсорів.

3. Дослідити можливість розробки біосенсорів на основі конкуренції різних ферментів в біоселективному елементі за субстрат та проаналізувати особливості їхнього функціонування.
4. Розробити біосенсиори непрямого мультиферментного аналізу та оцінити перспективність їхнього застосування.
5. Обґрунтувати технологічні схеми і методики виготовлення мультиферментних біосенсорів, створити лабораторні прототипи таких пристроїв.
6. Провести апробацію розроблених мультиферментних біосенсорів при аналізі реальних зразків та провести верифікацію отриманих результатів.

Об'єкт дослідження: біохімічні реакції за участі мультиферментних систем, іммобілізованих на поверхню різних електрохімічних перетворювачів.

Предмет дослідження: електрохімічні перетворювачі, схеми електрохімічного аналізу, біосенсиори на основі декількох ферментів.

Методи дослідження: методи іммобілізації ферменту (ковалентна зшивка, фотополімеризація, електрополімеризація та фізична сорбція); амперометрія, кондуктометрія, метод циклічної вольтамперометрії, метод електрохімічної імпедансної спектроскопії, спектрофотометрія; високоефективна рідинна хроматографія; атомно абсорбційна спектроскопія; електронна мікроскопія; статистичні методи аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. В роботі вперше проаналізовано та систематизовано різні стратегії розробки мультиферментних біосенсорів для застосування в медицині, контролі біотехнологічних процесів, сільському господарстві, екологічному моніторингу та науковій практиці. Запропоновано нові методики тестування амперометричних та кондуктометричних сенсорів та підбору оптимальних схем електрохімічного аналізу. Показано, що використання запропонованих методик при розробці біосенсорів призводить до покращення робочих параметрів цих пристроїв (чутливість, селективність, диференційність, тощо).

Розроблено низку нових електрохімічних мультиферментних біосенсорів на основі каскадів ферментативних реакцій для визначення лактози (Патент України № 36831), мальтози (Патент України № 43335), та ацетилхоліну, досліджено їхні аналітичні характеристики та продемонстровано особливості функціонування.

Вперше запропоновано новий варіант амперометричного біосенсора для визначення АТФ (Патент України № 78106) та глутамату на основі принципу конкуренції декількох ферментів за субстрат, наведено основні переваги таких мультиферментних біосенсорів та індивідуальні особливості їхнього функціонування.

Запропоновано нові електрохімічні біосенсиори на основі мультифункціонального використання декількох ферментів для визначення іонів важких металів, ЕДТА, цистеїну і активності креатинкінази та проведено аналіз їхніх основних аналітичних характеристик.

Вперше лабораторні прототипи розроблених мультиферментних біосенсорів було успішно апробовано при аналізі реальних зразків (сироватка крові, молоко, фруктові соки, фармацевтичні препарати, водні зразки доквілля та ін.) та показано високу кореляцію отриманих результатів з даними традиційних методів аналізу.

Практичне значення отриманих результатів. Розроблено фундаментальні та технологічні основи створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів для практичного застосування в медицині, контролі біотехнологічних процесів, сільському господарстві, екологічному моніторинзі та науковій практиці.

Розроблені методики тестування перетворювачів та вибору схем електрохімічного аналізу дадуть змогу розробляти та створювати ефективні мультиферментні біосенсори з покращеними аналітичними характеристиками (чутливість, селективність, діапазон визначення, стабільність тощо).

Створені лабораторні прототипи мультиферментних біосенсорів та запропоновані технологічні схеми і методики виготовлення таких приладів, а також отримані результати апробації розроблених мультиферментних біосенсорів при аналізі реальних зразків, можуть бути основою комерційних приладів для експресного аналізу відповідних речовин, що можуть вироблятися як в Україні, так і за кордоном.

Особистий внесок здобувача. Дисертаційну роботу сплановано і виконано здобувачем, в основному, самостійно. Особистий внесок здобувача є визначальним на всіх етапах дослідження. Вся експериментальна робота проводилась дисертантом особисто, або за його безпосереднього керівництва та участі в проведенні експериментів. Основні напрямки дослідження, мету роботи, положення та висновки сформульовано разом із науковим консультантом, д.б.н., проф. С.В. Дзядевичем. Основні результати експериментальних досліджень із розробки мультиферментних електрохімічних біосенсорів для потреб медицини, сільського господарства та екологічного моніторингу отримано автором особисто. Частина експериментальних робіт із розробки різних типів мультиферментних біосенсорів та їх апробації при роботі з реальними зразками проведено у тісному співробітництві з к.б.н., н.с. Кучеренко І.С., к.б.н., с.н.с. Пешковою В.М., к.б.н., с.н.с. Архиповою В.М., к.б.н., н.с. Марченко С.В., к.б.н., н.с. Саяпіною О.Я., к.б.н., м.н.с. Дудченко О.Є., к.б.н., м.н.с. Мацишиним М.Й., PhD Щувайло О.М., м.н.с. Кучеренко Д.Ю., студ. Книжниковою Д.В., professor Jaffrezic-Renault N., professor Akata B., doctor Lagarde F., doctor Cespuglio R., doctor Marinesco S., результати досліджень опубліковано в спільних публікаціях. Обговорення та аналіз результатів досліджень проведено з науковим консультантом д.б.н., проф. Дзядевичем С.В., академіком НАН України, д.б.н., проф. Єльською Г.В., академіком НАН України, д.б.н., проф. Солдаткіним О.П., яким здобувач висловлює щиро вдячність за надану допомогу та увагу до дисертаційної роботи. Також дисертант щиро вдячний співробітникам Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України д.ф.-м.н., с.н.с. Куклі О.Л. за допомогу в розробці вимірювальних систем з використанням мультиферментних біосенсорів та д.т.н., с.н.с. Мельнику В.Г. з Інституту електродінаміки НАН України за корисні поради стосовно кондуктометричного методу вимірювання.

Апробація матеріалів дисертації. Результати досліджень було представлено на фахових конференціях: International conference of instrumental methods of analysis. Modern trends and applications (Iraklion, Crete, Greece, 2005), Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, 2006, 2008, 2010, 2012, 2014, 2016, 2018), Ukrainian-German Symposium on

Nanobiotechnology (Київ, 2006), Міжнародна конференція «MADICA» (Tunisie 2006, 2010), Conference of young scientists dedicated to the 185th anniversary of Gregor Mendel (Київ, 2007), Міжнародна наукова конференція «Фізичні методи в екології, біології та медицині» (Львів, 2008), International Conference “Functional Materials” ICFM (Партеніт, 2007, 2009, 2013), Bridges in life sciences annual scientific meeting regional cooperation for health, science and technology (Bratislava, Slovak Republic, 2008, 2009, 2011), X Український Біохімічний з’їзд (Одеса, 2010), International scientific conference “Shevchenkivska vesna” (Київ, 2013), International Workshop “Recent Advances in Micro/Nano- and Multi-Target Assays” (Київ, 2013), Всеукраїнська науково-практична конференція «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 2013, 2016), International interdisciplinary scientific conference “Biologically active substances and materials” (Новий Світ, 2013), FEBS Congress “Biological Surfaces and Interfaces” (Catalonia, Spain, 2013), International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (Львів, 2014, 2015, 2016 та Київ 2018), E-MRS 2015 Spring Meeting, Symposium “Materials and biosensor systems for *in vitro* diagnostic applications” (France, Lille, 2015), Journee de printemps de la SCF en Rhone Alpes (France, Lyon, 2015), 41-st FEBS Congress «Molecular and systems biology for a better life» (Turkey, 2017).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 31 науковій статті у фахових вітчизняних наукових журналах та закордонних виданнях, в 34 тезах доповідей на наукових конференціях, отримано 5 патентів України на корисну модель та винахід.

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 314 найменувань. Робота викладена на 378 сторінках машинописного тексту. Результати дисертації та допоміжні матеріали проілюстровано на 108 рисунках та представлено в 25 таблицях.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень. При розробці біосенсорів було використано наступні препарати та реактиви: глюкозооксидаза (ГОД) з *Penicillium vitale* (КФ 1.1.3.4) активністю 130 од. акт./мг фірми «Діагностикум» (Львів, Україна) та із *Aspergillus niger* (КФ 1.1.3.4) з активністю 272 од. акт./мг фірми «Genzyme» (Великобританія); інвертаза із пекарських дріжджів (КФ 3.2.1.26) активністю 355 од. акт./мг фірми „Fluka” (Швейцарія); мутаротаза із нирки свині (КФ 5.1.3.3.) активністю 100 од. акт./мг фірми „Biozyme Laboratories Ltd” (Великобританія); уреаза із бобів сої (КФ 3.5.1.5) активністю 31 од. акт./мг фірми „Fluka” (Німеччина); гексокіназа (ГК) із *Saccharomyces cerevisiae* (КФ 2.7.1.1) з активністю 30,6 од. акт./мг фірми «Sigma-Aldrich» (США); аргіназа з печінки бика (КФ 3.5.3.1) з активністю 105 од. акт./мг фірми «Sigma-Aldrich» (США); креатинкіназа (КК) із м’язів кроля (КФ 2.7.3.2) з активністю 32 од. акт./мг виробництва фірми «Serva Feinbiochemica» (Німеччина); глутаматоксидаза (ГЛОД) із *Streptomyces sp.* (КФ 1.4.3.11) з активністю 7 од. акт./мг фірми «Yamasa Corporation» (Токіо, Японія) люб’язно надана доктором Х. Кусакубе; β-галактозидаза з *E.coli* (КФ 3.2.1.23) активністю 149 од. акт./мг фірми „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина); α-глюкозидаза з *Bacillus stearothermophilus* (КФ

3.2.1.20) активністю 109 од.акт./мг фірми „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина); α -глюкозидаза з пекарських дріжджів (КФ 3.2.1.20) активністю 5,7 од.акт./мг фірми „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина); ацетилхолінестераза (АцХЕ) із електричного вугря (КФ 3.1.1.7) активністю 426 од.акт./мг фірми „Sigma-Aldrich Chemie” (Німеччина); холіноксидаза (ХОД) з *Alcaligenes sp.* (КФ 1.1.3.17) активністю 15 од. акт./мг фірми “Sigma-Aldrich” (Японія); аскорбатоксидаза (АОД) із *Cucurbita sp.*, (КФ 1.10.3.3) активність 308 од.акт./мг фірми „Fluka” (Німеччина); апіраза з картоплі (КФ 3.6.1.5) активністю 7,7 од.акт./мг фірми “Sigma–Aldrich Chemie S.a.r.l.” (Франція).

Інші компоненти біоселективних мембран: бичачий сироватковий альбумін (БСА), гліцерол, 25 %-й та 50%-й водний розчин глютарового альдегіду (ГА), мета-орто- та пара-фенілендіамін та (1,5 ваг. %) розчину рутеній (III) нітрозил нітрату $[Ru(NO)(NO_3)_x(OH)_y, (x + y = 3)]$ фірми «Sigma–Aldrich Chemie» (Франція та Німеччина); PVA-SbQ фірми «Тоуо Gosei Kogyo Co. Ltd» (Японія), DEAE-Dextran фірми «Fluka Biochemica» (Франція); лактітол фірми «Fluka» (Швейцарія).

Використані в роботі субстрати та інтерферуючі речовини: аргінін, ацетилхолін, лактоза, мальтоза, сахароза, фруктоза, арабіноза, манноза, холін, креатинфосфат, сечовина, глюкоза, глутамат, аденозин-5'-трифосфат (АТФ), аденозин-5'-дифосфат (АДФ), аденозин-5'-монофосфат (АМФ), гуанозин-5'-трифосфат (ГТФ), урацил-5'-трифосфат (УТФ), гомованілінова, аскорбінова, аспарканова, сечова кислоти, водний розчин пероксиду водню (3 ваг. %), цистеїн, глутамін, допамін, ацетамінофен (парацетамол), аденозин та формальдегід були виробництва «Sigma–Aldrich Chemie» (Німеччина). Кофактори ферментів, що використовувались в роботі, тіамініпрофосфат (ТПФ) фірми «Biorpharma» (Україна) (ліофілізат для приготування розчинів для ін'єкцій); $Mn(NO_3)_2$ та $Mg(NO_3)_2$ були фірми «Helicon» (Росія).

В роботі використовували робочі буфери: ТРІС $(HOCH_2)_3CNH_2$, рН 8,1; НЕРЕС, рН 7,4; фосфатний буфер (KH_2PO_4-NaOH) рН 7,4, 6,5, 6,8 фірми Sigma–Aldrich Chemie (Німеччина) та вітчизняного виробництва. Концентрацію буфера вибирали (від 2,5 до 100 мМ) в залежності від методики вимірювання (амперметрія чи кондуктометрія) та характеристик відповідного біосенсора. Як розчинники використовували: ацетонітрил, диметилсульфоксид (ДМСО), метанол, етанол (фірми Sigma–Aldrich Chemie GmbH, Німеччина). Як інгібітори ферментів використовували іони важких металів в формі модельних розчинів відповідних солей: $Hg(NO_3)_2$, $Cu(NO_3)_2$, $Pb(NO_3)_2$, $Co(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2$, $AgNO_3$, $Sr(NO_3)_2$ («х.ч.»), фірми «Helicon» (Росія) та вітчизняного виробництва. Реактиваторами ферментів після інгібування виступали піридин-2-альдоксиметилйодид (ПАМ-2), цистеїн та етилендіамінтетраоцетова кислота (ЕДТА) фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (Німеччина). Інші неорганічні сполуки, що використовувались в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.” та „ч.д.а.”.

В роботі використовувались кондуктометричні перетворювачі на основі золота, нікелю, платини та нержавіючої сталі, виготовлені згідно наших рекомендацій в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова (м. Київ, Україна). Амперометричні датчики на основі платинових дискових електродів,

мікроелектроди на основі вуглецевого волокна та на основі платинового дроту виготовлялися в нашому відділі.

Усі дослідження з використанням різних методик проводилися щонайменше із 3-кратним повторенням. Завдяки використанню диференційного режиму вимірювань, неспецифічних змін вихідного сигналу, пов'язаних з коливанням температури, рН середовища, електричними наводками, не було.

Результати представлено як середньо-квадратичне значення \pm квадратична похибка середнього значення за результатами n незалежних експериментів. Різницю між двома групами оцінювали з використанням t -тесту Стьюдента. Різниця вважалася статистично достовірною, коли $P \leq 0,05$.

Усі роботи з біологічними рідинами проводили згідно правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження та оптимізація перетворювачів і вимірювальних схем. Тестування амперометричних перетворювачів, які будуть використані для конструювання біосенсорів, є важливою стадією, що передуює розробці будь-якого біосенсора, оскільки базові характеристики електрохімічних перетворювачів впливають на аналітичні характеристики біосенсорів, що створюються на їх основі. Використання ж при розробці біосенсорів перетворювачів з неприйнятними характеристиками унеможливує створення конкурентоспроможних біосенсорів. Перший етап запропонованої методики тестування амперометричних перетворювачів полягає у перевірці чутливості до пероксиду водню методом циклічної вольтамперометрії. Вивчення циклічних вольтамперограм, отриманих на амперометричних перетворювачах, дозволяє аналізувати їхню чутливість до певних субстратів при різних потенціалах. Крім того, застосовуючи метод циклічної вольтамперометрії, можна обирати оптимальний потенціал для подальшої роботи в амперометричному режимі. На рис. 1 представлено залежність величини відгуків амперометричного перетворювача на додавання у вимірювальну комірку 100 мкМ пероксиду водню від прикладеного до нього потенціалу (0,3-0,85 В). Показано, що найбільша чутливість до пероксиду водню у амперометричних датчиків, що досліджувалися, спостерігається при робочому потенціалі від 0,5 до 0,6 В.

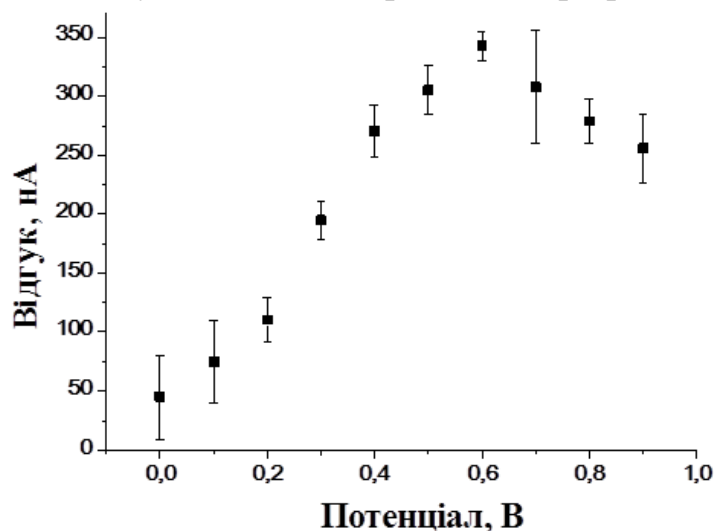


Рис. 1. Залежність величин відгуків амперометричного перетворювача на додавання у вимірювальну комірку 100 мкМ пероксиду водню від прикладеного потенціалу (0,3-0,85 В) відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Наступна стадія методики полягає у дослідженні відтворюваності сигналів амперометричних перетворювачів. Для цього протягом декількох годин з інтервалом у 20 хвилин отримували відгуки амперометричних перетворювачів на одну і ту ж концентрацію перексиду водню (8 мкМ), при цьому перетворювач весь час між вимірюваннями залишався у буферному розчині з постійним перемішуванням. Стандартне відхилення відгуків всіх перетворювачів була в межах $\pm 5\%$, що є допустимим показником, тому проведення подальших процедур по вдосконаленню відтворюваності перетворювачів даного типу не є необхідним.

Наступною стадією запропонованої методики тестування амперометричних перетворювачів є дослідження чутливості біосенсорів на інші електроактивні речовини, що можуть бути присутні у реальних біологічних зразках. Як відомо, найбільш проблематичною інтерферуючою речовиною є аскорбінова кислота, яка може бути присутня в багатьох біологічних зразках в досить високих концентраціях. Поява неспецифічного сигналу біосенсора на аскорбінову кислоту і подібні інтерферуючі компоненти обумовлена їх електрохімічним окисненням на електроді.

Використовуючи результати, отримані методом циклічної вольтамперограми, було побудовано залежність чутливості амперометричного перетворювача до 10 мМ аскорбінової кислоти від величини прикладеного робочого потенціалу (рис. 2).

На відміну від відгуків на перексид водню (рис. 1), відгуки на аскорбінову кислоту при збільшенні потенціалу зростають практично лінійно. Оскільки при менших потенціалах відгуки даних електродів на аскорбінову кислоту значно менші, то для роботи з реальними зразками, в яких може бути присутні електроактивні речовини такі, як аскорбінова кислота, бажано обирати більш низький потенціал або вирішувати проблему іншим чином.

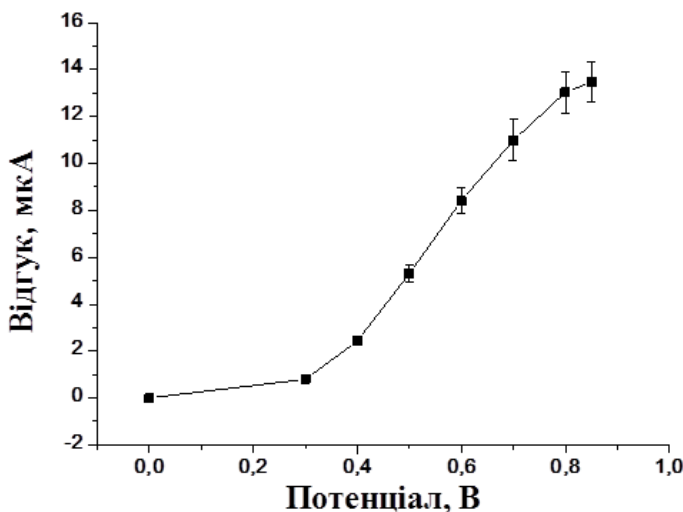


Рис. 2. Залежність величин відгуків амперометричного перетворювача на додавання у вимірювальну комірку 10 мМ аскорбінової кислоти від прикладеного потенціалу (0-0,85В) відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Для покращення селективності даних перетворювачів застосовували поліфенілдіамінову (ПФД) мембрану, що була нанесена на поверхню платинового дискового робочого електрода за допомогою методу електрополімеризації. Для дослідження впливу полімерної мембрани на відгуки датчиків було протестовано їхню чутливість до перексиду водню та інтерферуючих речовин до та після модифікації поліфенілдіаміном. Отримані результати представлено в таблиці 1. В якості інтерферуючих речовин використовували аскорбінову кислоту та ще ряд

речовин, що часто вносять похибку в роботу амперометричних біосенсорів таких, як допамін, цистеїн, сечова кислота та парацетамол.

Таблиця 1

Дослідження селективності амперометричних перетворювачів до та після нанесення ПФД мембрани

Сполука	Відгук сенсора без ПФД мембрани, нА	Відгук сенсора з ПФД мембраною, нА
Пероксид водню, 50 мкМ	$34,7 \pm 2,6$	$27,6 \pm 0,8$
Аскорбінова кислота, 500 мкМ	$33,2 \pm 1,7$	$0,9 \pm 0,5$
Сечова кислота, 100 мкМ	$10,6 \pm 1,8$	0
Парацетамол, 100 мкМ	$7,3 \pm 1,2$	0
Цистеїн, 100 мкМ	$2,8 \pm 0,4$	$0,02 \pm 0,02$
Допамін, 20 мкМ	$14,8 \pm 1,3$	$1,2 \pm 0,3$

До нанесення ПФД мембрани перетворювач досить сильно реагував на інтерферуючі речовини, відповідно могли виникнути проблеми при використанні біосенсора на основі даного перетворювача при аналізі біологічних рідин. Втім, після нанесення ПФД мембрани відгуки перетворювачів на інтерферуючі речовини зникли зовсім або зменшились до незначних розмірів, при цьому чутливість перетворювачів до пероксиду водню впала лише на 20% (табл. 1).

Наприкінці проходження повного циклу тестування амперометричних перетворювачів за запропонованою методикою, необхідно було провести перевірку даних перетворювачів під час їхньої роботи в складі біосенсорів. З використанням біосенсора на основі ГОД було отримано вольтамперограми в робочому буферному розчині та при додаванні у вимірювальну комірку 0,5 мМ глюкози (рис. 3). Ці вольтамперограми було порівняно з вольтамперограмою, отриманою на тому ж самому амперометричному перетворювачі без ферментної мембрани.

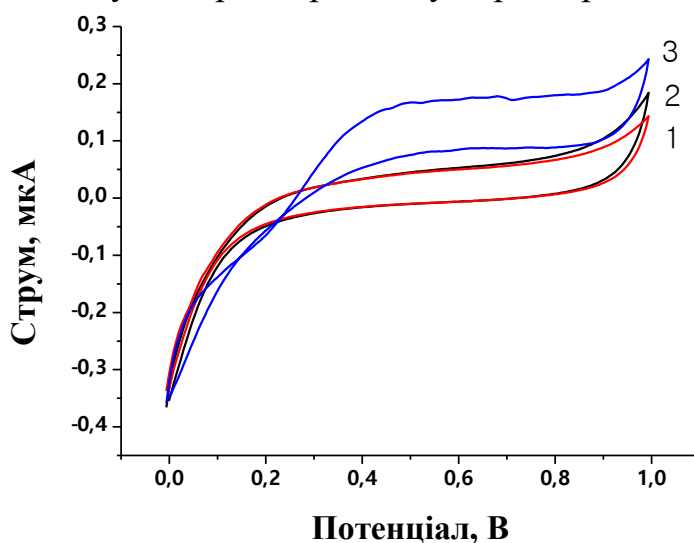


Рис. 3. Циклічні вольтамперограми, отримані на амперометричному перетворювачі без ферментної мембрани (1), після нанесення ферментної мембрани на основі глюкозооксидази (2) та при додаванні 0,5 мМ глюкози у вимірювальну комірку (3)

Як видно з рис. 3, вольтамперограми, отримані на амперометричному перетворювачі з нанесеною ферментною мембраною та без неї практично не відрізнялись, що свідчить про те, що сама біоселективна мембрана не впливає на

характеристики перетворювача. При додаванні глюкози у вимірювальну комірку, вольтамперограма змінюється суттєво (рис. 3, крива 3), що свідчить про роботу фермента, а, відповідно, і про те, що протестовані в нашій роботі амперометричні перетворювачі з успіхом можуть бути використані для розробки біосенсорів.

Наступним завданням була розробка мікроперетворювачів на основі карбонових волокон для проведення *in vivo* аналізів. Спочатку необхідно було провести металізацію електродів для досягнення кращої чутливості перетворювача до пероксиду водню та, навпаки, зменшення чутливості до інтерферуючих речовин. Спочатку було проведено експерименти для визначення оптимальних умов електронанесення каталітичного шару рутенію, для чого було отримано ряд металізованих мікроелектродів за різних потенціалів впродовж процесу електроосадження рутенію (в діапазоні від -0,35 В до -0,65 В). Оцінка активності отриманих електродів до пероксиду водню з концентрацією 1 мМ проводилась при їхній роботі за постійного потенціалу +0,4 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Виявлено сильну залежність густини анодного струму від потенціалу електронанесення рутенію (рис. 4). Максимум густини анодного струму з відповідною максимальною чутливістю до пероксиду водню спостерігався для електродів, металізованих при потенціалі -0,45 В, який і був застосований в подальшому для рутенізації електродів.

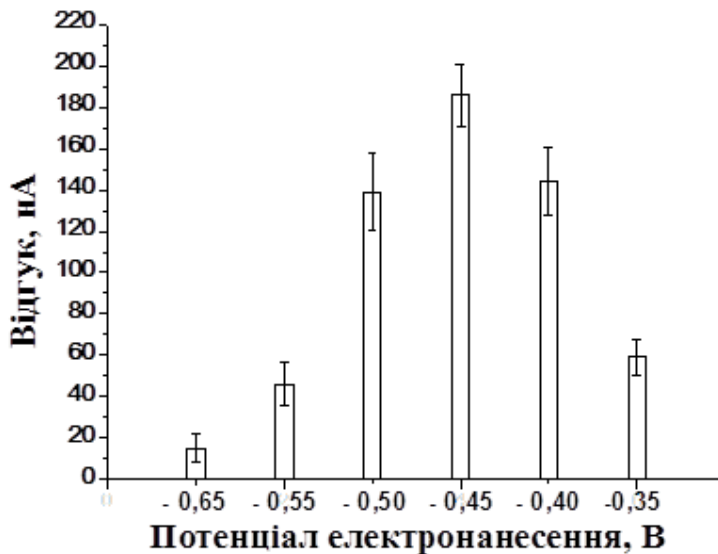


Рис. 4. Залежність чутливості до пероксиду водню металізованих рутенієм мікроелектродів, отриманих за різних величин потенціалів електронанесення каталітичного шару рутенію

На рис. 5 представлено результати порівняння калібрувальних кривих визначення пероксиду водню мікроперетворювачем до та після його рутенізації.

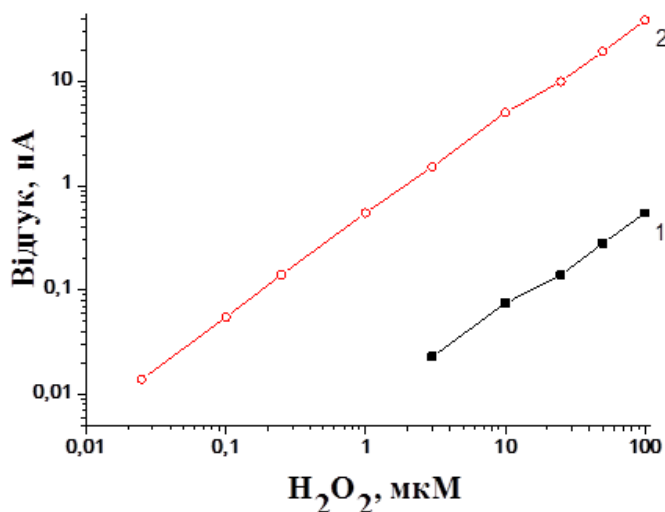


Рис. 5. Калібрувальні криві перетворювача на основі карбонового волокна на пероксид водню до (1) та після (2) рутенізації чутливої поверхні

За отриманими даними видно, що величина відгуку, а відповідно, і чутливість мікроперетворювача до пероксиду водню зростала майже на два порядки після рутенізації (границя визначення пероксиду водню до та після металізації мікроперетворювача – 3 мкМ та 0,05 мкМ, відповідно). Однак при вибраній для рутенізованих електродів робочій напрузі +0,4 В може відбуватися також окиснення супутніх електроактивних компонентів (наприклад, аскорбінової кислоти), що спотворює результати визначення. Тому наступним етапом дослідження було вивчення селективності розроблених перетворювачів.

Для оцінки селективності рутенізованих вуглецево-волоконних електродів, яка є дуже важливою характеристикою особливо для *in vivo* застосування, використовували вісім електроактивних речовин (аскорбінова, сечова, аспарагінова, гомованілінова кислоти, L-цистеїн, ацетамінофен, допамін, глутамін). Як голі, так і рутенізовані електроди не давали відгуків на глутамін та гомованілінову кислоту. Найпомітніший ефект полягав у зменшеній чутливості рутенізованого електроду до аскорбінової кислоти порівняно з неметалізованими електродами (понад 20 разів). Відгуки перетворювачів на інші електроактивні речовини також зменшувались, за виключенням допаміну. Незважаючи на позитивні ефекти, отримані після металізації електродів, слід зазначити, що рутенізовані вуглецево-волоконні мікроелектроди все ж не є достатньо селективними до пероксиду водню для вимірювань *in vivo*. Тому для поліпшення селективності мікроелектродів було використано додаткові полімерні мембрани. Орто-, мета- і пара- ізомери фенілендіаміну були електрохімічно окиснені на поверхні електродів з утворенням напівпроникних полімерних мембран.

Слід відзначити значні розбіжності у властивостях електродів з покриттям полімерами, отриманими з різних ізомерів фенілендіаміну (рис. 6). Перетворювачі з рутенієвим шаром, покриті *мета*-фенілендіаміновим полімером, демонстрували найкращу селективність до пероксиду водню. Мембрана, нанесена з використанням *орто*-фенілендіаміну, характеризувалася дуже обмеженою здатністю до виключення перешкод, а мембрани, генеровані з *пара*-фенілендіаміном, є також не ефективними внаслідок обмеженої дифузії пероксиду водню через мембрану. Отже, в нашому випадку для рутенізованих електродів було обрано *мета*-фенілендіамін, як найкращий з ізомерів, для нанесення додаткової напівпроникної мембрани.

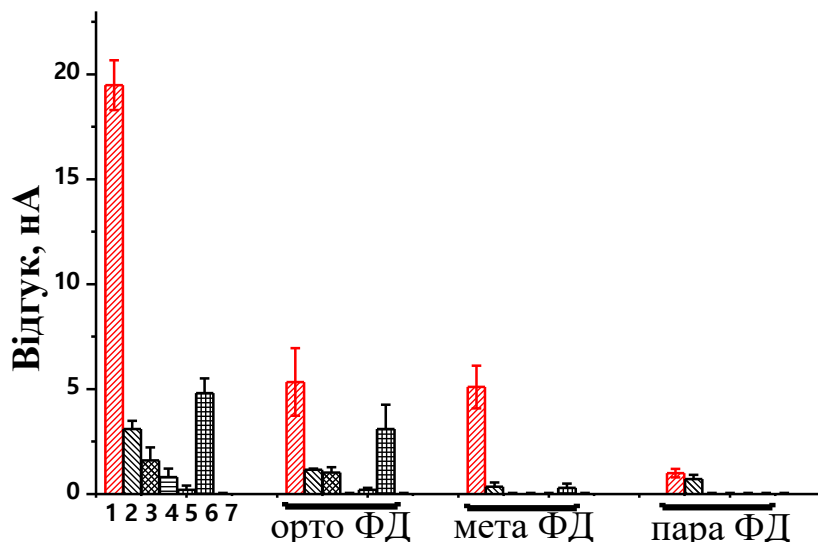


Рис. 6. Порівняння відгуків мікроелектродів на основі рутенізованого вуглецевого волокна (без та з полімерними мембранами на основі різних ізомерів ФД) до 50 мкМ пероксиду водню (1), 500 мкМ аскорбінової кислоти (2), цистеїну (3), 100 мкМ сечової кислоти (4), 100 мкМ ацетамінофен (5), допамін (6), аспарагінова кислота (7).

Серед електрохімічних біосенсорних методів визначення кондуктометричний метод використовується завдяки низці його переваг, таких як відсутність електродних електрохімічних реакцій, технологічно складних електродів порівняння, можливості уникнути фарадеївських процесів на електродах та можливості використання змінної напруги малої амплітуди. Найбільш вживаними та ефективними є кондуктометричні перетворювачі на основі двох зустрічно-гребінчастих планарних металевих електродів. Наразі є потреба у створенні методики попереднього аналізу параметрів кондуктометричних перетворювачів, від яких залежить можливість створення конкурентноспроможних біосенсорів. Методика повинна містити ряд процедур, що дозволять оцінювати перспективність подальшого використання відповідного кондуктометричного перетворювача при розробці біосенсорів.

Для виконання першого етапу тестування кондуктометричних перетворювачів (дослідження чутливості) використовували метод електрохімічної імпедансної спектроскопії. Тестування проводили для 2-х груп електродів, виготовлених із золота та платини. В результаті були одержані імпедансні спектри для водних розчинів хлориду калію різної концентрації. Виявилось, що зміна реальної частини адмітансу при додаванні хлориду калію у вимірювальну комірку, по-різному зростає з підвищенням частоти струму в залежності від металу перетворювача.

Чутливість електродної пари перетворювача визначали, як відгук на одиницю концентрації внесеного аналіту (в випадку внесення солі це $\Delta Y_{Re}/\Delta C_{KCl}$), що чисельно визначається похідною від концентраційної залежності. Візьмемо дану похідну чисельно і приведемо її значення для однієї з пар електродів типових перетворювачів з золота та платини (рис. 7). В даному випадку результати приведено лише для однієї пари електродів. Як можна побачити, чутливість перетворювача залежить від концентрації хлориду калію нелінійно. Найкращими перетворювачами вважаються такі, в яких зменшення чутливості відбувається повільно і є можливість їхнього функціонування в широкому діапазоні концентрації солі. Продемонстровано що даний діапазон зазвичай не перевищує 10 мМ KCl, а при роботі на низьких частотах він відчутно менший ніж при роботі на високих.

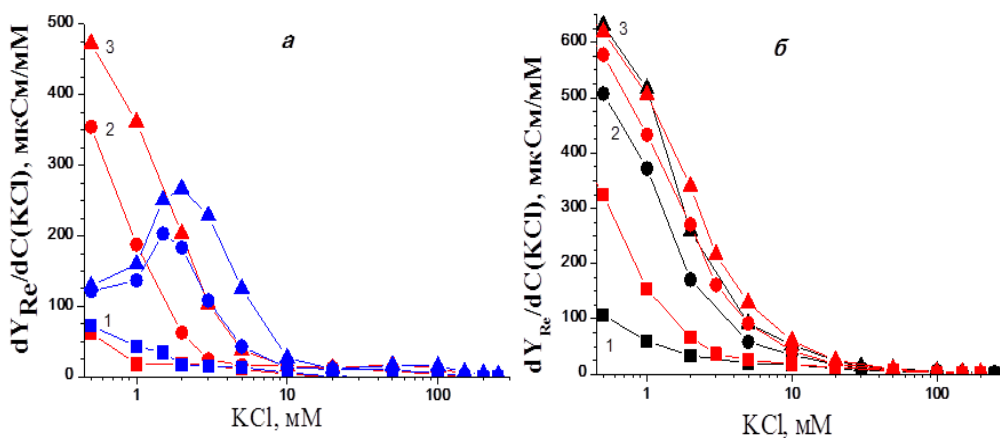


Рис. 7. Чутливість кондуктометричних перетворювачів із золота (а) і платини (б) до KCl за різних частот: (1) 10 кГц (1), 50 кГц (2), 100 кГц (3))

Аналізуючи дані, зображені на рис. 7, видно, що показник $dY_{Re}/dC(KCl)$, який виражає чутливість до хлориду калію загалом найвищий у КП з платини. Крім того, можна відібрати для подальшої роботи лише найкращі перетворювачі і видалити брак. Наприклад, з графіків видно (рис. 7), що золотий перетворювач №2

характеризується суттєво нижчою чутливістю до хлориду калію ніж інші золоті та платинові перетворювачі. Це свідчить про можливі дефекти його виготовлення (неоднорідність підшару хрому, що використовується для покращення адгезії золота або порушення температурного режиму вакуумного напилення), або пошкодження поверхні чутливої частини перетворювача при використанні, тому варто уникати використання таких КП при подальшому створенні мультиферментних біосенсорів.

Диференційний режим вимірювання полягає у детекції різниці сигналів з робочої та референтної мембран біосенсора. Використання диференційного режиму в роботі дозволяє підвищити чутливість сенсора та мінімізувати шуми та неінформативні впливи (температура, рН, світло та ін.). Одним з ключових параметрів для роботи КП в диференційному режимі є ідентичність обох пар електродів. Неідентичність пар електродів може бути спричинена недосконалою технологією виготовлення КП, механічним пошкодженням або забрудненням їхніх активних поверхонь.

Щоб бути впевненим в нормальній роботі КП в диференційному режимі різниця між відгуками двох пар електродів одного КП має бути невеликою і постійною. Даний параметр було протестовано для КП, виготовлених з золота та платини (рис. 8). При цьому за межу критичної розбіжності значень реальної складової адмітансу між парами електродів прийняли 3% відхилення.

Було показано, що різниця між відгуками на хлорид калію обох пар електродів (R і L) основної частини перетворювачів знаходилась в межах 3%. Лише для КП «Au3» та «Pt2» ця розбіжність чутливості пар електродів перевищувала значення 3%, відповідно, дані перетворювачі були відбраковані.

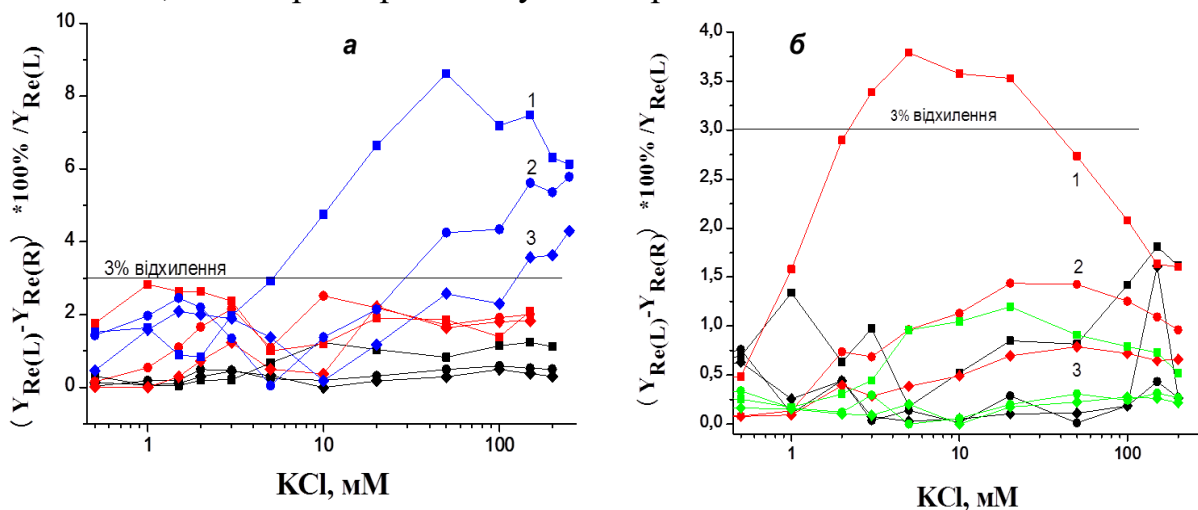


Рис. 8. Залежності різниці реальної складової адмітансу між парами електродів кондуктометричних перетворювачів із золота (а) та платини (б) від концентрації КСІ за різних частот: (10 кГц (1), 50 кГц (2), 100 кГц (3))

Для коректної роботи перетворювача важливо також оцінити співвідношення його сигналу і шуму. Проведені дослідження демонстрували дві закономірності. По-перше, кондуктометричні перетворювачі при роботі за високих частот мали співвідношення сигнал/шум набагато кращим, ніж за низьких частот. По-друге, функціонування перетворювачів в сольових розчинах за високих концентрацій було менш стабільним.

Наступною задачею було порівняти характеристики портативного потенціостату, розробленого та виготовленого в Інституті електродинамики НАН України згідно наших рекомендацій, із потенціостатом PalmSens (Нідерланди) для того, щоб визначити, чи здатен потенціостат українського виробництва замінити PalmSens при роботі з біосенсорами.

Спочатку порівнювали чутливості амперометричних перетворювачів до пероксиду водню із використанням двох потенціостатів. Було проведено порівняння відгуків перетворювачів, під'єднаних до обох потенціостатів, та отримано циклічні вольтамперограми за відсутності та за наявності пероксиду водню в робочій комірці.

При проведенні експерименту, спочатку отримували 1-2 циклічні вольтамперограми у чистому робочому буфері, після чого до комірки додавали пероксид водню (0,5 мМ) і отримували ще 3-4 вольтамперограми. Умови проведення циклічних вольтамперограм були однаковими для обох потенціостатів. Типові циклічні вольтамперограми обох потенціостатів зображені на рис. 9. Потенціостат PalmSens демонструє менший рівень шуму, більш плавну вольтамперограму і має більшу чутливість до пероксиду водню, у порівнянні з потенціостатом українського виробництва. В обох випадках, суттєве збільшення сигналу при додаванні пероксиду водню спостерігається при потенціалі від +0,6 В.

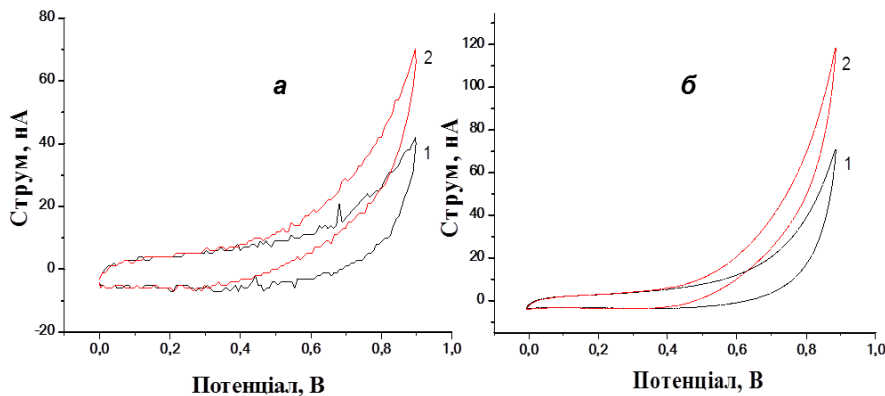


Рис. 9. Циклічні вольтамперограми, отримані на потенціостаті українського виробництва (а) та PalmSens (б) до (1) та після (2) додавання пероксиду водню

Також було отримано калібрувальні криві на пероксид водню, необхідні для оцінки чутливості перетворювача та потенціостату. Калібрування проводилось додаванням до робочої комірки 0,2 мМ H_2O_2 кожні 30 секунд при потенціалі 0,8 В відносно внутрішнього електрода порівняння. Відгуки сенсорів були прямо пропорційні концентрації пероксиду водню у всьому діапазоні концентрацій, причому чутливість PalmSens була дещо більшою. Втім, чутливості потенціостату українського виробництва було цілком достатньо для достовірного визначення концентрацій пероксиду водню.

Важливою характеристикою сенсорів та потенціостатів є відтворюваність відгуків при додаванні однакових концентрацій досліджуваної речовини. Відтворюваність відгуків показує, чи не змінюється чутливість перетворювача та потенціостату під час тривалої роботи. Саме тому третім етапом порівняння потенціостатів стало дослідження відтворюваності відгуків на пероксид водню. Для цього, впродовж декількох годин безперервної роботи отримували відгуки на одну і ту ж саму концентрацію пероксиду водню (0,5 мМ). Відтворюваність відгуків на пероксид водню майже однакова для обох потенціостатів (відносне стандартне відхилення становило 8% для українського потенціостату, 7% для PalmSens).

Наступним етапом порівняння двох потенціостатів було підключення до них електрохімічного біосенсора на основі глюкозооксидази та порівняння його аналітичних характеристик та відтворюваності відгуків на глюкозу.

Калібрувальні криві біосенсорів для визначення глюкози, отримані з використанням одного і того ж перетворювача, підключеного по черзі до обох потенціостатів, наведені на рис. 10. Лінійний діапазон вимірювання глюкози складав 0,1 – 2 мМ для потенціостату українського виробництва та 0,05 – 2 мМ для PalmSens. Форма калібрувальних кривих була однаковою, що свідчило про відносну незалежність характеристик біосенсора від підключеного потенціостату.

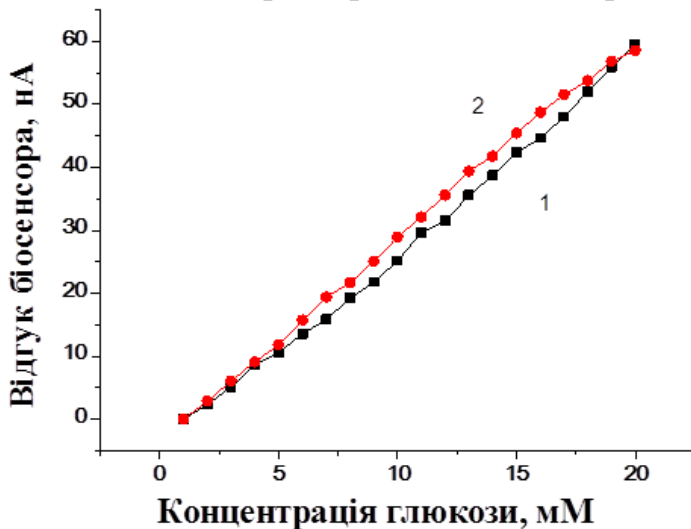


Рис. 10. Типові калібрувальні криві біосенсорів на основі ГОД для визначення глюкози, отримані із використанням потенціостату українського виробництва (1) та PalmSens (2)

За результатами усіх експериментів було складено порівняльну таблицю, в яку увійшли аналітичні характеристики систем вимірювання вмісту пероксиду водню та глюкози із використанням обох потенціостатів (табл. 2).

Таблиця 2

Порівняння характеристик амперометричних сенсорів, робота яких тестувались на потенціостатах українського виробництва та PalmSens

Параметри сенсорів	PalmSens	Потенціостат укр. виробництва
Величина відгуку на 0,5 мМ H_2O_2 , нА	121,4	101,4
Шум базової лінії чистого сенсора, нА	0,5	1,3
Межа визначення H_2O_2 , мкМ	6,2	19,2
Час відгуку на H_2O_2 , хв.	< 1 хв	< 1 хв
Похибка вимірювання H_2O_2 , %	8,0	6,8
Кількість одночасно вимірюваних каналів	1 (з мульти-плексором - 8)	4
Величина відгуків на глюкозу (0,5 мМ), нА	11,5	13,1
Шум базової лінії біосенсора, нА	0,4	1,1
Межа визначення глюкози, мкМ	52	126
Час відгуку на глюкозу, хв.	< 1 хв	< 1 хв
Похибка вимірювання глюкози, %	4,4	7,9
Орієнтовна ціна потенціостату, грн.	20000 грн	1500 грн

Для проведення порівняльного аналізу функціонування різних установок для кондуктометричних вимірювань, вибрали найбільш відомий та вивчений біосенсор на основі ГОД для визначення глюкози. Дані біосенсори перевіряли протягом одного робочого дня на трьох різних установках для кондуктометричних вимірювань: на стаціонарній установці на основі нановольтметра “Unipan-233” (СУНУ), на експериментальній установці на основі портативного аналізатора «МСР-3» (ЕУПА) та багатофункціональній електрохімічній системі VoltaLab (БЕСВ). Для оцінки функціональності самих біосенсорів та перевірки можливості їхньої роботи з трьома різними вимірювальними установками було отримано калібрувальні криві біосенсорів на основі ГОД для визначення глюкози (рис. 11).

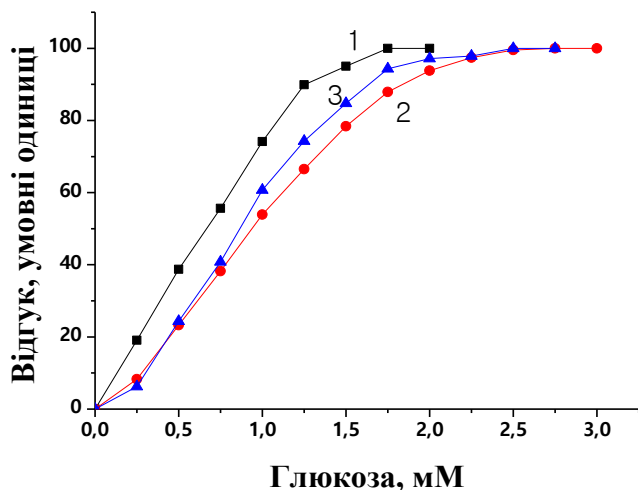


Рис. 11. Залежності відгуків біосенсора від концентрації глюкози при роботі на СУНУ (1), ЕУПА (2) та БЕСВ (3)

З рис. 11 видно, що калібрувальні криві біосенсора для визначення глюкози мало відрізнялись одна від одної, лише дещо змінився лінійний діапазон та мінімальна границя визначення на різних установках для кондуктометричних вимірювань. Наприклад, при використанні ЕУПА лінійний діапазон був 0 – 1,5 мМ, а при використанні СУНУ та БЕСВ він становив 0 – 1,25 мМ. Мінімальна концентрація глюкози, яку дозволяв визначити такий біосенсор складала 0,01 мМ на СУНУ, 0,005 мМ на ЕУПА та 0,001 мМ на БЕСВ, при співвідношенні сигналу і шуму не менше 3 (за рахунок різного шуму базової лінії).

При дослідженні відтворюваності роботи біосенсора впродовж робочого дня вимірювали відгуки на повторні внесення однакової концентрації глюкози (0,3 мМ) до вимірювальних комірок трьох різних установок для кондуктометричних вимірювань. Було з'ясовано, що стандартне відхилення результатів не перевищувало 4% при роботі на усіх трьох варіантах вимірювальних установок. Також було показано, що кондуктометричний біосенсор на основі ГОД проявляв високу селективність по відношенню до глюкози при роботі на усіх трьох установках, не реагуючи на такі інтерференти, як фруктоза, арабіноза, лактоза, мальтоза, галактоза, маноза. Відповідно, біосенсори можуть успішно функціонувати у складі усіх трьох різних установок для кондуктометричних вимірювань.

Розробка біосенсорів на основі каскадів ферментативних реакцій для прямого визначення субстратів. На даний момент серед мультиферментних біосенсорів найбільш розповсюдженими є сенсори на основі каскаду ферментативних реакцій, в результаті яких субстрат поступово перетворюється до

електроактивного продукту, який можна зареєструвати електрохімічними перетворювачами напряму або з використанням медіаторів.

В роботі було розроблено низку біосенсорів на основі різних каскадів ферментативних реакцій для визначення лактози, мальтози, аргініну та ацетилхоліну. Усі ці каскади приведені на рис.12. По ходу проходження кожного з цих каскадів реакцій, цільова речовина розщеплюється до електроактивних речовин, які детектуються за допомогою електрохімічних перетворювачів. Величини сигналів на ці електроактивні речовини і є мірою концентрації цільової речовини в розчині.

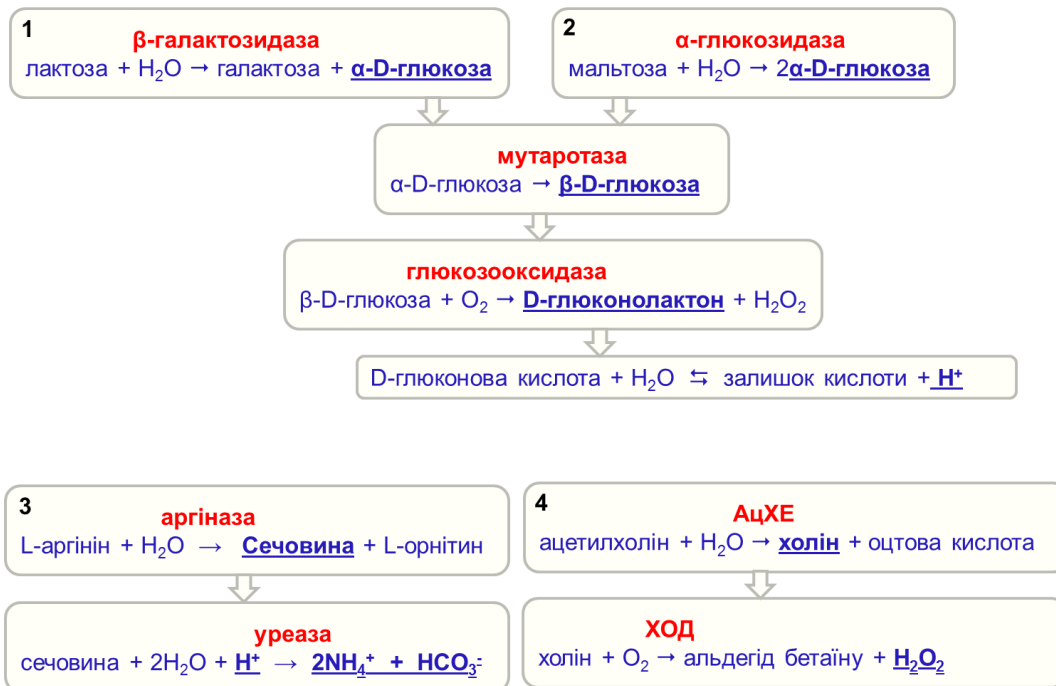


Рис.12. Каскади ферментативних реакцій, що лежать в основі роботи біосенсорів

На прикладі відповідних біосенсорів ми акцентуємо увагу на найбільш важливих етапах розробки різних біосенсорів на основі каскадів ферментативних реакцій.

На рис. 13 приведено типові відгуки та калібрувальні криві триферментного біосенсора для визначення лактози. Можна бачити, що відгуки та калібрувальні криві отримували як для визначення лактози, так і для визначення глюкози, оскільки в складі триферментного біосенсора була глюкозооксидаза, чутлива до глюкози. Відповідно на усіх стадіях розробки даного триферментного біосенсора необхідно контролювати чутливість біосенсора ще й до глюкози.

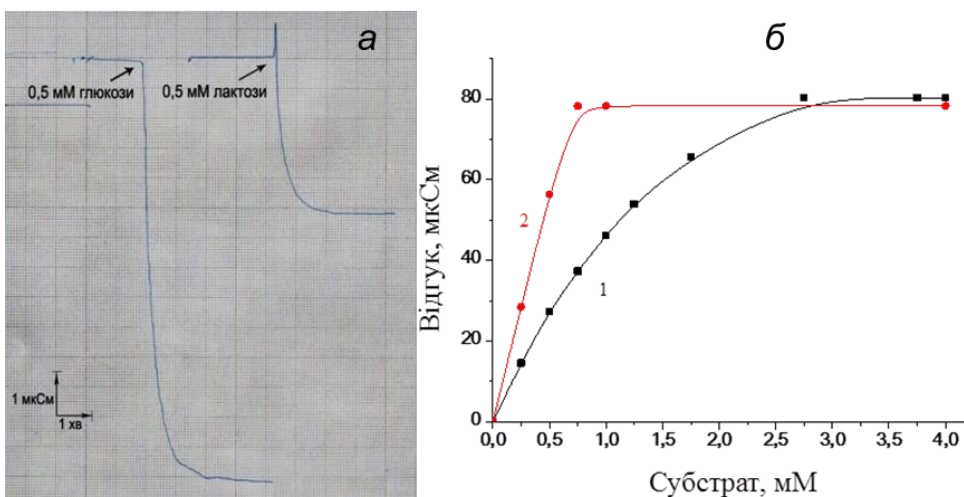


Рис. 13. Типові відгуки (а) та калібрувальні криві (б) мультиферментного біосенсора для визначення лактози (1) та глюкози (2)

Одним з основних етапів розробки усіх типів мультиферментних біосенсорів є оптимізація основних параметрів іммобілізації ферментів в складі біоселективного елементу. На рис.14 приведено результати експериментів з оптимізації умов іммобілізації ферментів (уреази та аргінази) при створенні біосенсора для визначення аргініну. Спочатку підбирали оптимальну концентрацію уреази в складі біоселективного елементу. Отримані результати свідчать (рис.14а), що при зміні концентрації ферменту в розчині з 0,25 % до 0,5% відгуки біосенсора зростають в рази, а при подальшому збільшенні до 5 % ферменту в розчині для приготування мембран біосенсора відгуки збільшуються повільніше. Найбільші сигнали біосенсорів отримано при концентрації уреази 5%. Далі вибирали оптимальну концентрацію аргінази (рис.14б). Максимальні відгуки біосенсорів на основі двох ферментів спостерігаються при концентрації аргінази в складі біосенсора 5%. Саме ці значення оптимальних концентрацій ферментів використовували в подальших експериментах. Потім визначали оптимальну концентрацію глютарового альдегіду як зшиваючого агента (рис.14в). Згідно графіка можна дійти висновку, що концентрації ГА від 0,1% до 0,5%, є найбільш ефективними для процесу іммобілізації ферментів. Окрім того, в роботі було перевірено, як впливає тривалість іммобілізації на чутливість створеного біосенсора до аргініну(рис.14г). Виявилось, що оптимальним часом формування ферментних мембран на поверхні кондуктометричного перетворювача за допомогою глютарового альдегіду було 30 хвилин.

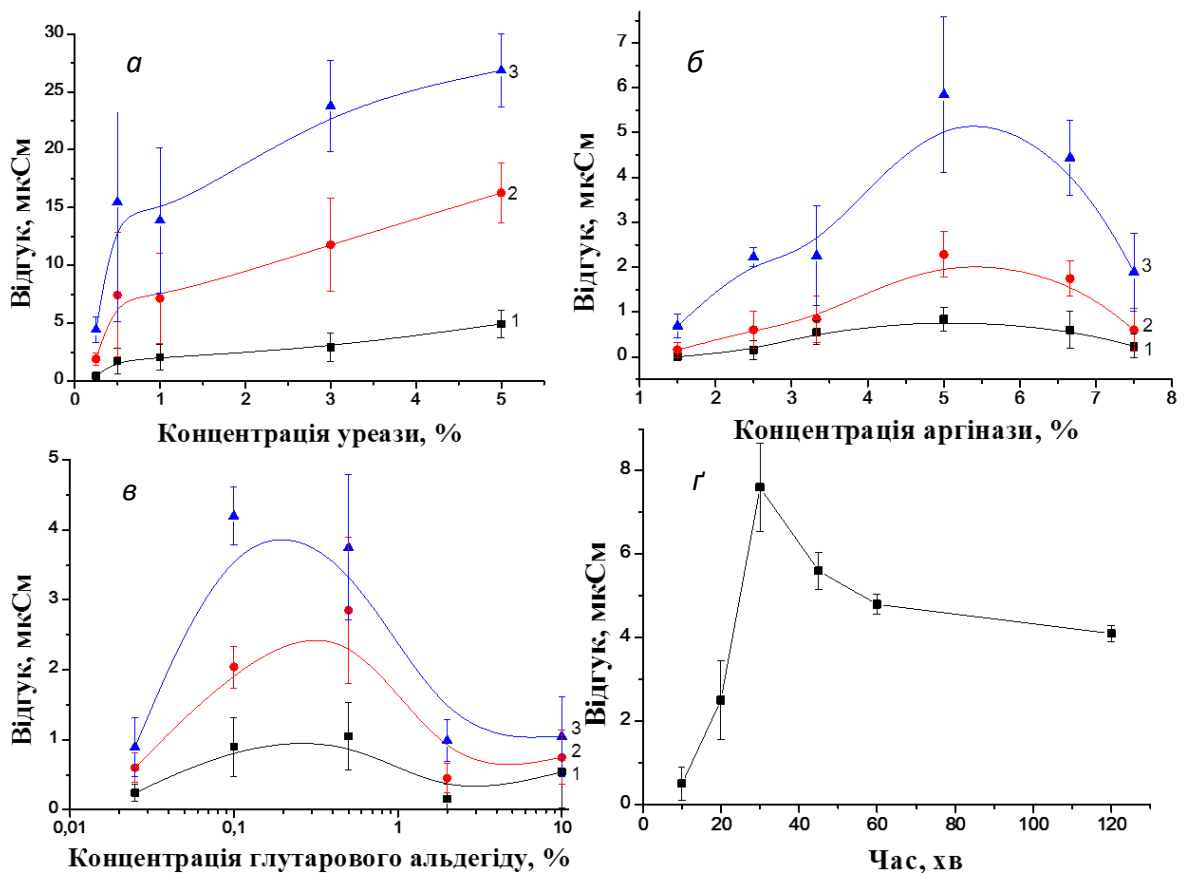


Рис. 14. Залежності величин відгуків кондуктометричних біосенсорів від концентрації уреази (а), аргінази (б), глютарового альдегіду (в) та тривалості іммобілізації (г) при створенні біомембран

Схожі експерименти проводились для визначення оптимального складу та умов іммобілізації ферментів в усіх біоселективних елементах мультиферментних біосенсорів, що розроблялись в даній роботі.

Наступним важливим етапом створення мультиферментних біосенсорів, є дослідження впливу параметрів аналізованого розчину на роботу біосенсора. На рис. 15 приведено дослідження впливу параметрів розчину на роботу триферментного біосенсора для визначення мальтози. Перевіряли вплив рН, концентрації робочого буферного розчину та іонної сили на роботу кондуктометричного біосенсора.

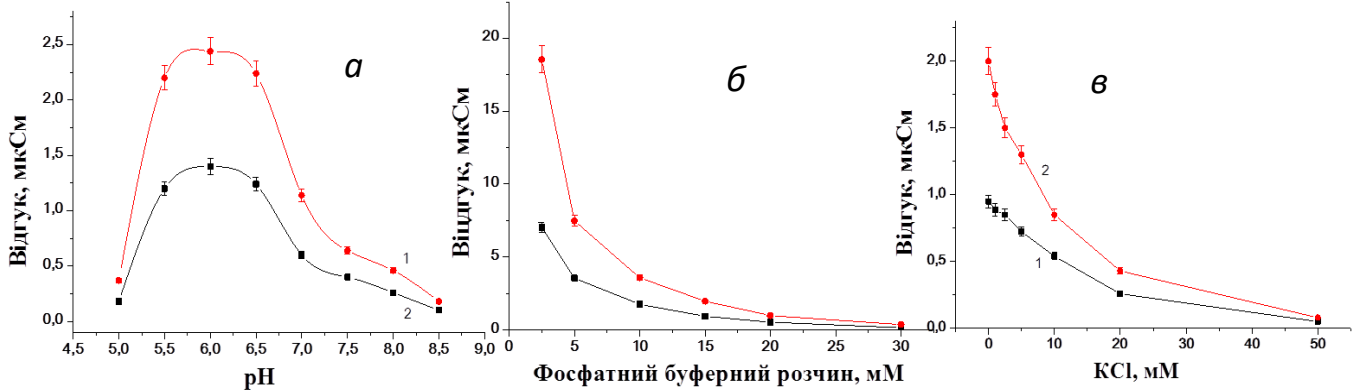


Рис. 15. Залежності величин відгуків триферментного біосенсора на внесення 0,5 мМ мальтози (1) та 0,5 мМ глюкози (2) від рН (а), концентрації фосфатного буферного розчину (б) та іонної сили розчину (в)

Як відомо, після іммобілізації фермент може мати інший рН оптимум роботи в порівнянні з його нативним станом. Ще більш складна ситуація виникає коли біоселективний елемент біосенсора складається з трьох ферментів, кожен з яких має свій рН оптимум. Вимірювання проводили в універсальному буферному розчині, який складається із суміші різних буферних розчинів та характеризується однаковою буферною ємністю в широкому діапазоні значень рН. Графіки залежності величин відгуків на додавання у вимірювальну комірку субстратів від рН мали дзвоноподібну форму з максимумом при рН 6,0 (рис. 15а). На рис. 15б представлено залежності величин відгуків мультиферментного біосенсора на внесення 0,5 мМ глюкози та 0,5 мМ мальтози від різних концентрацій буферного розчину. З графіку видно, що при збільшенні концентрації буферного розчину величини відгуків зменшуються. Цей ефект пов'язаний із зростанням фонові провідності та буферної ємності розчину, що треба враховувати при проведенні аналізів в подальшому. Далі було встановлено, що при збільшенні іонної сили відгуки як на мальтозу, так і на глюкозу зменшуються. Спостерігається різке падіння величин сигналів на обидва субстрати за концентрації КСІ у вимірювальній комірці до 20 мМ, а при концентрації більше 20 мМ КСІ величина сигналу складає вже менше 10 % від початкового відгуку і далі змінюється несуттєво. Тому при проведенні вимірювань за допомогою кондуктометричного біосенсора дуже важливим є контроль іонної сили аналізованих зразків.

Типові експерименти, приведені для мальтозного біосенсора, проводились для усіх розроблених в роботі мультиферментних біосенсорів. Отримані результати

стосовно дослідження впливу параметрів розчину на роботу кожного біосенсора необхідно буде враховувати при роботі з реальними біологічними зразками.

Також при розробці кожного мультиферментного біосенсора необхідно досліджувати відтворюваність відгуків, стабільність при зберіганні біосенсора та селективність його відносно можливих інтерферентів.

На рис.16а приведено типові дослідження відтворюваності відгуків біосенсора, на прикладі триферментного біосенсора для визначення лактози. Протягом робочого дня з інтервалом в 30 хвилин отримували відгуки біосенсора на одну концентрацію лактози, при цьому біосенсор весь час між вимірюваннями залишався у буферному розчині з постійним перемішуванням. Вибрана для досліджень концентрація лактози 0,15 мМ знаходилася на лінійному відрізку калібрувальної кривої біосенсора. Мультиферментний біосенсор характеризувався високою відтворюваністю сигналів ($RSD = 3,84\%$).

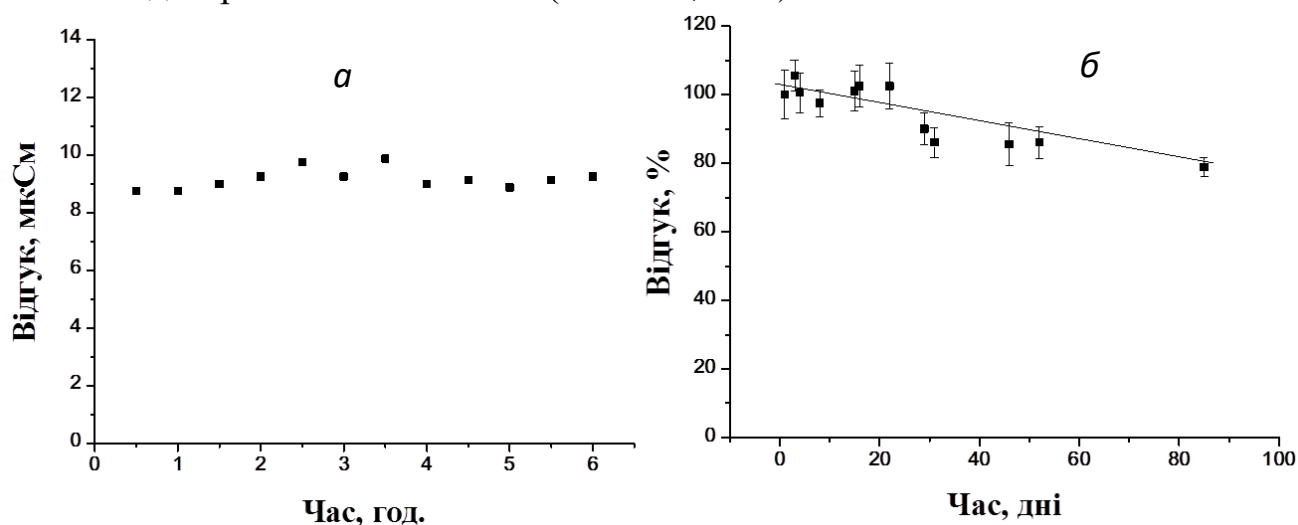


Рис.16 Відтворюваність відгуків (а) та стабільність під час зберігання (б) біосенсора для визначення лактози. Концентрація лактози - 0,15 мМ

З метою можливої подальшої комерціалізації мультиферментних біосенсорів необхідно проводити ряд досліджень по вивченню стабільності біосенсорів при зберіганні (рис. 16б). Біосенсори для визначення лактози зберігались при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ в сухих умовах. На перший день після створення лактозних біосенсорів було отримано відгук на внесення 0,15 мМ лактози, величина якого була прийнята за 100%. Подальші виміри проводились через певний проміжок часу (3-8 днів). Відгук біосенсора знизився лише на 22% протягом трьох місяців зберігання, що є досить високим показником.

Для проведення в подальшому робіт з реальними зразками необхідно проводити перевірку селективності кожного мультиферментного біосенсора. На прикладі лактозного біосенсора було проведено низку дослідів із дослідження впливу інтерферуючих компонентів на його відгук. Дослідження проводились в 10 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5, в експериментальну комірку з біосенсором вносили 0,5 мМ концентрації можливої інтерферуючої речовини (глюкоза, мальтоза, сахароза, фруктоза, арабіноза та манноза). Відгук сенсора розраховувався у відсотках, причому за 100 % був обраний відгук біосенсора на 0,5 мМ концентрацію лактози. В цілому, лактозний біосенсор виявився селективним по відношенню до

ряду інтерферуючих речовин, які можуть бути присутні в зразках, за виключенням глюкози (172 %) та мальтози (8 %). Відгук лактозного біосенсора на глюкозу є цілком зрозумілий, оскільки до складу ферментної мембрани лактозного біосенсора входить глюкозооксидаза. Тому для визначення саме лактози в зразках, в яких може бути присутня глюкоза, необхідним є наявність другого біосенсора, чутливого тільки до глюкози.

Останнім етапом розробки кожного мультиферментного біосенсора є перевірка його аналітичних характеристик. Наприклад, після оптимізації умов виготовлення та функціонування біферментного біосенсора для визначення ацетилхоліну (АцХ) була побудована типова калібрувальна крива (рис. 17). Лінійна ділянка даної калібрувальної кривої описується рівнянням $I=1376,5 \cdot C + 2,6$ ($R^2=0,999$), де C – концентрація ацетилхоліну (мкМ).

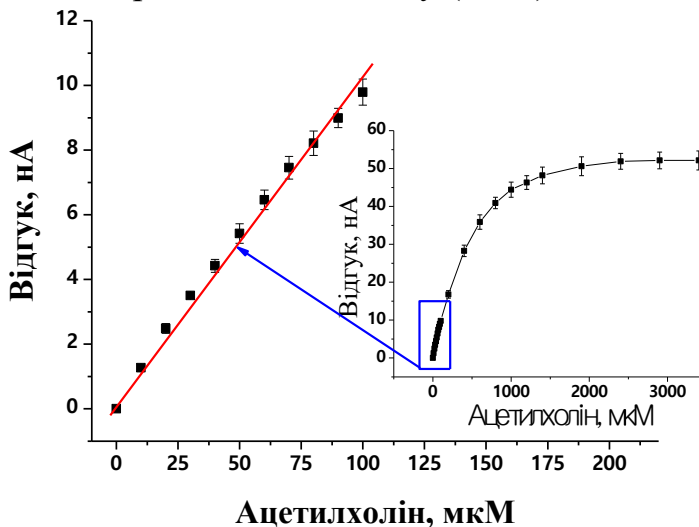


Рис. 17. Калібрувальна крива біосенсора на основі холіноксидази та ацетил-холінестерази для визначення ацетилхоліну.

Використовуючи рівняння калібрувальної кривої та інші параметри вираховувались основні аналітичні характеристики мультиферментного біосенсора (табл. 3). З отриманих даних, можна зробити висновок, що біосенсор характеризується високою чутливістю до субстрату за стабільної відтворюваної роботи, а також має досить малий шум та дрейф базового сигналу, що дає змогу визначати низькі мікромолярні концентрації ацетилхоліну.

Таблиця 3

Основні аналітичні характеристики біосенсора для визначення АцХ

Чутливість, нА/мМ	Лінійний діапазон роботи, мкМ	Мінімальна межа вимірювання, мкМ	Шум базової лінії, нА	Похибка вимірювань, %	Дрейф базової лінії, нА/с
98	10-200	3,8	0,3	3,5	0,1

Під час виконання даної частини роботи продемонстровано перспективність розробки низки бі- та триферментних біосенсорів на основі каскадів ферментативних реакцій для прямого визначення субстратів та визначено переваги та недоліки даного типу біосенсорів.

Біосенсори на основі конкуренції ферментів за субстрат. Часто при розробці біосенсорів під час вибору ферментативної системи дуже важко підібрати

каскад ферментів таким чином, щоб вони послідовно каталізували реакції з утворенням відповідного продукту. Інколи можна використовувати принцип конкуренції ферментів за субстрат, що полягає у використанні двох ферментів для одного субстрату, один з яких генерує електроактивний продукт, а інший – ні. Відповідно даний підрозділ присвячено саме такому типу мультиферментних біосенсів на основі конкуренції ферментів за субстрат.

При виконанні даної частини роботи було розроблено два мультиферментних біосенсора на основі конкуренції ферментів за субстрат. Їхні ферментативні реакції приведено на рис.18. Перший біосенсор був на основі глюкозооксидази (ГОД) та гексокінази (ГК) для визначення АТФ. Цей біосенсор є чутливим до обох субстратів, як до глюкози, так і до АТФ, через конкуренцію між ферментами за глюкозу. Якщо до аналізованого середовища внесено тільки глюкозу, має місце реакція за участю глюкозооксидази, і електрохімічний відгук біосенсора пропорційний у певному діапазоні до концентрації глюкози, що генерується біосенсором, приймається за 100 %. При внесенні АТФ, має місце реакція за участю гексокінази, спричиняючи зменшення відгуку на глюкозу, причому це зменшення є пропорційним до концентрації АТФ в аналізованому розчині.

Другий біосенсор був також на основі двох ферментів: глутаматоксидази (ГЛОД) та аскорбатоксидази (АОД) (рис.18), які працюють незалежно. Глутаматоксидаза розщеплює глутамат до електроактивних речовин, а аскорбатоксидаза розщеплює аскорбінову кислоту (інтерферуюча речовина) для зменшення її впливу на роботу біосенсора для визначення глутамату.

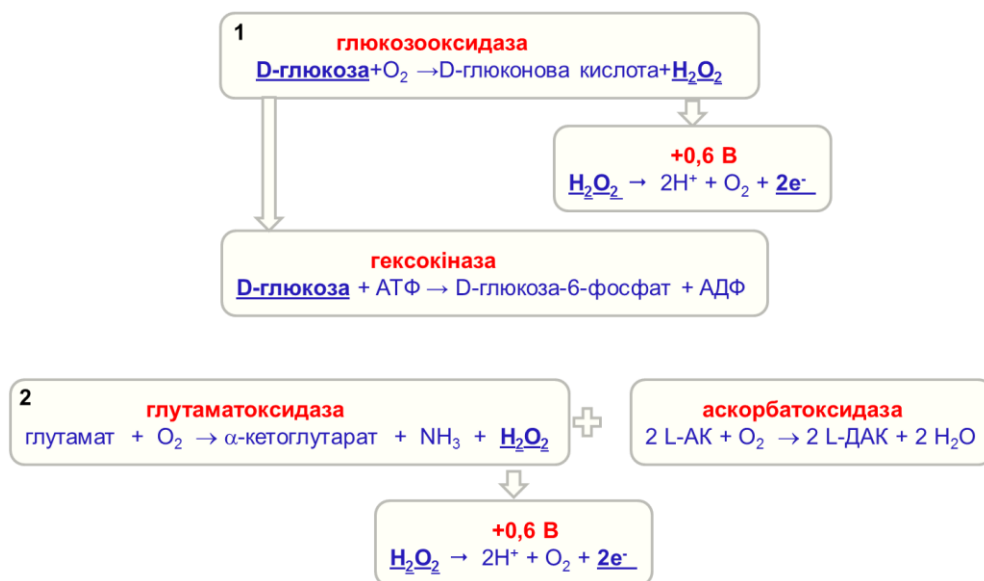


Рис.18. Принципи функціонування біосенсорів на основі конкуренції двох ферментів за субстрат (1) та роботи незалежних двох ферментів (2)

Насамперед, вивчали характеристики розробленого двоферментного біосенсора для визначення АТФ у модельних розчинах. Типові відгуки мікробіосенсора на основі ГОД/ГК до глюкози і АТФ наведені на рис. 19. Як видно, відгук на внесення глюкози було отримано за 20-25 с, а відповідні відгуки на АТФ – через 15-20 с. Кінетика генерування відгуків в обох випадках є очевидно майже однаковою. Додавання аперази (фермент, що гідролізує АТФ) до виміральної комірки показало, що відгуки мікробіосенсора на АТФ дійсно напряму залежать від концентрації АТФ.

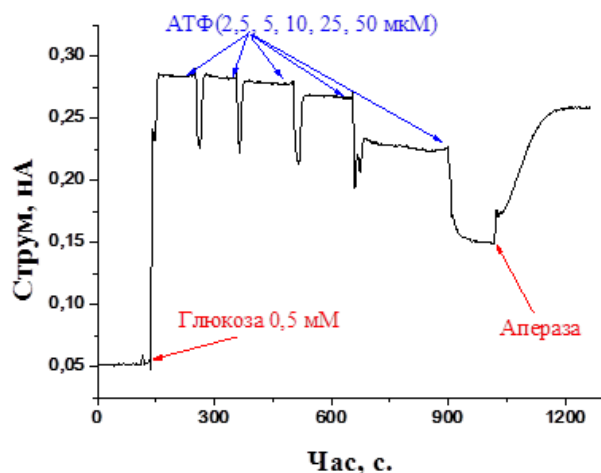


Рис. 19. Типові відгуки двоферментного мікробіосенсора на додавання глюкози, АТФ та аперази

Далі вивчали залежності відгуків мікробіосенсора на АТФ за різних концентрацій глюкози в аналізованому розчині (рис. 20). Нахил лінійних частин калібрувальних кривих і чутливість мікробіосенсора для визначення АТФ були, як правило, однаковими в діапазоні концентрацій глюкози 0,1-1,6 мМ. Хоча слід відзначити, що лінійний діапазон суттєво відрізнявся (чим вище концентрація глюкози, тим ширший лінійний діапазон). Проте збільшення концентрації глюкози понад 1,6 мМ спричиняло значне послаблення чутливості до АТФ (рис. 20а, крива 5). Це може бути викликано насиченням сенсорних відгуків на глюкозу в концентраціях понад 1,6 мМ (рис. 20б), а отже, і відсутністю пропорційності між концентрацією і відгуком. За високої концентрації глюкози та низьких концентрацій АТФ, ГК споживає невелику кількість глюкози і це помітно не впливає на відгук біосенсора на глюкозу. Подальше збільшення концентрації АТФ призводить до зменшення відгуку до глюкози та, відповідно, підвищеної чутливості до АТФ (рис. 20а, крива 5). Тому, для визначення АТФ необхідно, щоб концентрація глюкози знаходилась в лінійному діапазоні біосенсорного визначення глюкози. При фізіологічній концентрації глюкози в зразку (3,6-6,4 мМ і більше) зразок слід розводити, а концентрацію глюкози слід контролювати глюкозним сенсором на основі лише ГОД (другий біосенсор) перед тим, як двоферментний (ГОД/ГК) біосенсор може бути використаний для вимірювання концентрації АТФ.

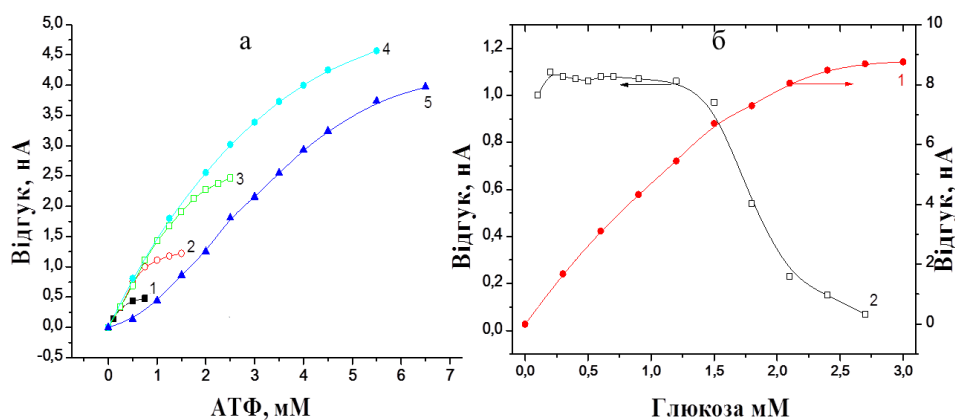


Рис. 20. Калібрувальні криві біосенсора (а) за різних концентрацій глюкози: 0,1(1); 0,3(2); 0,8(3); 1,6 (4); 2,5 (5) мМ. Залежність відгуків біосенсора (б) до глюкози (1) і до 0,5 мМ АТФ (2) за різних концентрацій глюкози

Під час розробки біосенсора для визначення АТФ, крім традиційних експериментів по підборі ферментативного складу біоселективного елементу, вибору оптимальних умов іммобілізації та перевірки впливу основних параметрів

аналізованого розчину виконувались експерименти по визначенню оптимальної концентрації магнію (кофактор гексокінази) та досліджувався вплив температури на роботу біосенсора.

Встановлено, що величина відгуку мікробіосенсора до АТФ сильно залежала від концентрації магнію в аналізованому розчині (рис. 21). Збільшення концентрації Mg^{2+} від 0 до 2 мМ спричинило 4,5-кратне підвищення відгуків мікробіосенсора на додавання у вимірювальну комірку 500 мкМ АТФ.

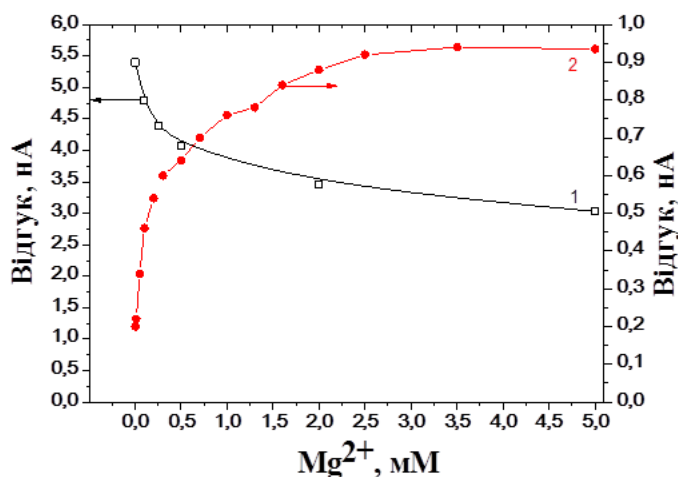


Рис. 21. Залежність величини відгуків двоферментного мікробіосенсора на 0,5 мМ глюкози (1) і 0,5 мМ АТФ (2) від концентрації Mg^{2+}

Щодо відгуку двоферментного мікробіосенсора на глюкозу, то був виявлений зворотній ефект. Збільшення концентрації Mg^{2+} від 0 до 2 мМ призводило до зменшення відгуку сенсора на 500 мкМ глюкозу. Подальше збільшення концентрації іонів магнію (більше 2 мМ) майже не впливало на відгуки біосенсора на АТФ і глюкозу. Подальші експерименти з вивчення характеристик мікробіосенсора виконували у робочому буфері з 2 мМ Mg^{2+} .

Для порівняння сенсорних відгуків за кімнатної та фізіологічної температури (22 та 37°C), а також, для визначення ролі кожного з ферментів (ГОД та ГК) у стабільності розробленого мікробіосенсора на основі мультиферментної системи, вивчали температурну залежність відгуків біосенсора (рис. 22).

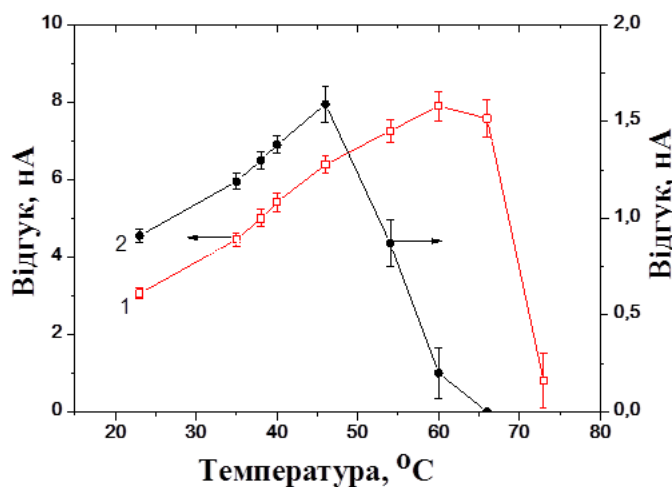


Рис. 22 Температурна залежність відгуків мікробіосенсора до 0,5 мМ глюкози (1) і 0,5 мМ АТФ (2).

Показано, що при збільшенні температури від 22 до 45°C відгуки сенсорів до глюкози та АТФ збільшуються. Проте, за подальшого зростання температури від 45 до 60°C відгук двоферментного мікробіосенсора на АТФ знижувався майже до нуля, а відгук на глюкозу надалі зростав і лише після 65°C різко зменшувався. Цілком

зрозуміло, що в цій двоферментній системі ГОД є більш термостабільним ферментом, ніж ГК, і для підвищення загальної стабільності системи необхідно стабілізувати ГК.

Основна ідея розробки двоферментного біосенсора для визначення глутамату полягала в покращенні селективності біосенсора за рахунок додавання у біоселективний елемент окрім ГЛОД ще й АОД. Як видно з рис. 23, відгуки біосенсора на основі ГЛОД/АОД на 0,5 мМ аскорбінову кислоту були в 5 разів меншими ніж у біосенсора на основі лише ГЛОД. При цьому відгуки на 0,1 мМ пероксиду водню були практично однаковими для обох типів біосенсорів. Відповідно при роботі із зразками з високою концентрацією аскорбінової кислоти необхідно до складу ферментної мембрани додавати АОД.

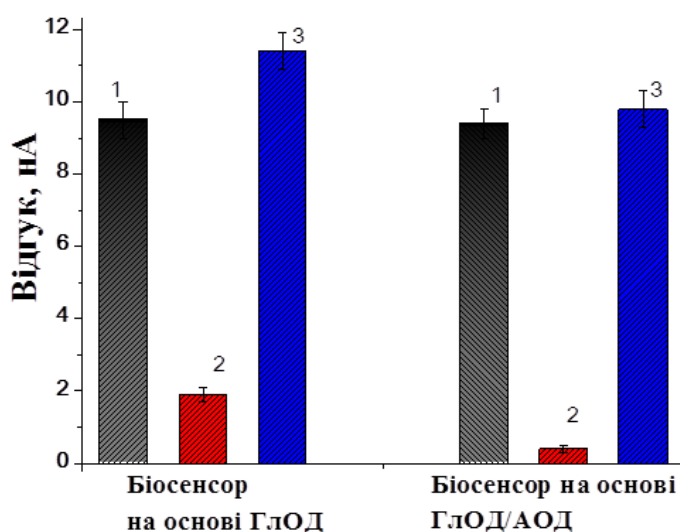


Рис. 23. Відгуки біосенсорів на основі ГЛОД та ГЛОД/АОД на додавання у вимірювальну комірку 0,1 мМ пероксиду водню (1), 0,5 мМ аскорбінової кислоти (2) суміші з 0,1 мМ пероксиду водню та 0,5 мМ аскорбінової кислоти

З рис. 24а можна бачити, що суміші інтерферуючих речовин (аскорбінова кислота (500 мкМ), сечова кислота (100 мкМ), цистеїн (100 мкМ), ацетамінофен (100 мкМ), допамін (20 мкМ), аспарагінова кислота (100 мкМ), глутамін (50 мкМ)) дають маленькі сигнали, близькі до таких, що можна отримати для 1,2 мкМ глутамату. Межа визначень мікробіосенсором глутамату становить 2,5 мкМ (сигнал/шум = 3), при чому цей відгук співвідноситься з відгуком на суміш з восьми інтерферуючих речовин, як 2/1.

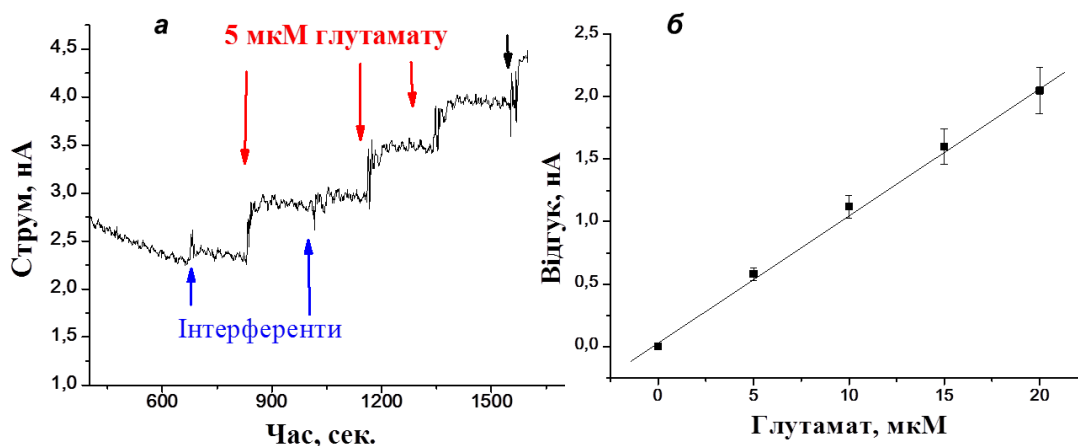


Рис. 24. Відгуки біосенсорів на основі ГЛОД/АОД на послідовне додавання у вимірювальну комірку 5 мкМ глутамату і суміші інтерферентів (а) та калібрувальна крива визначення низьких концентрацій глутамату (б).

Непрямий аналіз за допомогою мультиферментних біосенсорів. Крім описаних вище найбільш розповсюджених груп мультиферментних біосенсорів на основі каскадів ферментативних реакцій та конкуренції ферментів за субстрат, існує ще кілька типів мультиферментних біосенсорів. В даному розділі наведено результати щодо розробки декількох інших варіантів біосенсорів на основі мультифункціонального використання ферментів.

На рис. 25 приведено принципи функціонування двох мультиферментних біосенсорів для непрямого визначення субстратів. Перший біосенсор був для визначення активності креатинкінази (КК). В основі його роботи лежав біосенсор для визначення АТФ, описаний в попередньому підрозділі. Але коли у вимірювальну комірку додавали АДФ, креатин фосфат та креатинкіназу, починав продукуватись АТФ. Відповідно його перетворювала гексокіназа і починала більш активно конкурувати за глюкозу з глюкозооксидазою. Відповідно починав зменшуватись відгук на глюкозу. Швидкість зменшення цього відгуку була мірою активності креатинкінази в розчині.

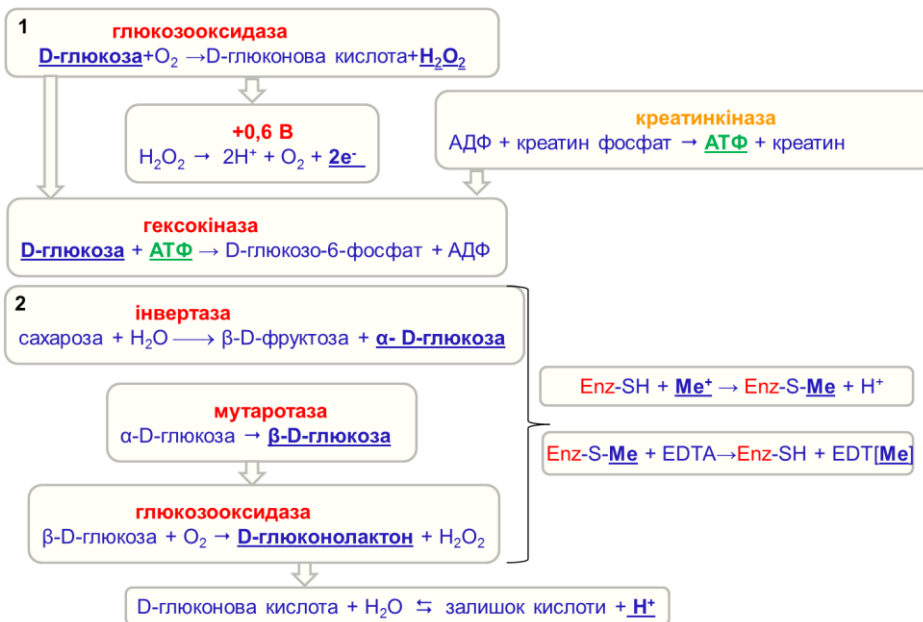


Рис. 25. Принципи функціонування мультиферментних біосенсорів для визначення активності ферментів (1) та непрямого визначення інгібіторів та комплексонів (2)

В основі роботи другого біосенсора лежав каскад ферментативних реакцій (за участю інвертази, мутаротази та ГОД), в ході яких сахароза розщеплювалась до електроактивних речовин. В принципі функціонування лежав ефект інгібування ферментів каскаду, а далі його реактивація. Спочатку ферменти інгібувалися іонами важких металів, а далі реактивувалися різними концентраціями ЕДТА або цистеїну. Відповідно рівень відновлення сигналу на сахарозу був мірою концентрації реактиватора.

КК має два субстрати – АДФ та креатинфосфат (КФ). Тому було важливо визначити оптимальні концентрації цих речовин для біосенсорного визначення активності КК. Залежність сигналу біосенсора від концентрації субстратів визначали для трьох концентрацій КК у вимірювальній комірці: 0,013 од.акт./мл, 0,038 од.акт./мл та 0,1 од.акт./мл, що відповідає всьому діапазону концентрацій КК при м'язових патологіях (у випадку 20-кратного розведення зразку крові). Спочатку перевіряли вплив концентрації АДФ, оскільки вартість АДФ є значно більшою, ніж креатинфосфату (рис. 26а). Виявилось, що найкращу чутливість до КК біосенсор

мав при 1 мМ АДФ, а подальше збільшення концентрації АДФ призводило до деякого зменшення чутливості до КК, що можна пояснити, оскільки АДФ є інгібітором КК. В подальших дослідженнях активність КК визначали саме при 1 мМ АДФ. Зменшення концентрації креатинфосфату одразу викликало зменшення відгуку біосенсора на КК (рис. 26б). Тому для того, щоб не зменшувати чутливість біосенсора, було вирішено і далі додавати до робочої комірки 10 мМ концентрацію креатинфосфату.

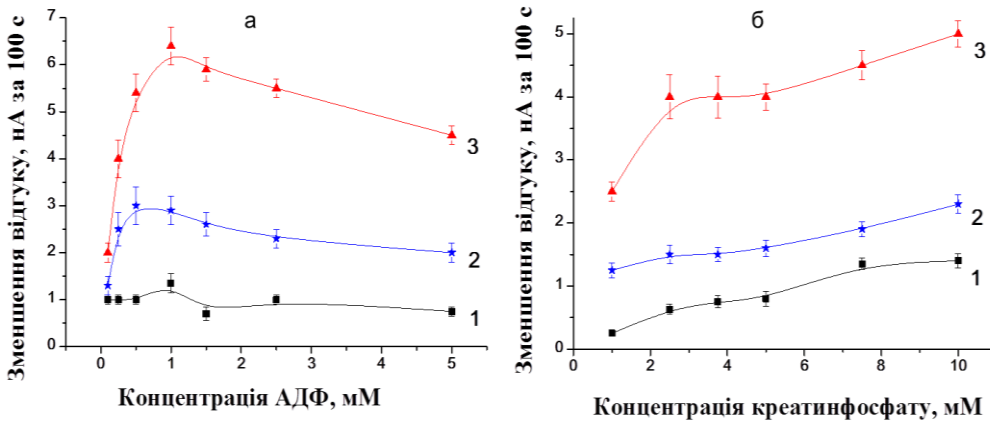


Рис. 26. Вплив концентрації АДФ (а) та креатинфосфату (б) на визначення активності КК (1 – 0,013 од.акт./мл, 2 – 0,038 од.акт./мл, 3 – 0,1 од.акт./мл)

Після дослідження умов роботи біосенсора були отримані калібрувальні криві для визначення КК. Як згадувалось раніше, біосенсор визначає активність КК за швидкістю продукування нею АТФ, а чутливість біосенсора до АТФ залежить від концентрації глюкози у розчині. Тому калібрувальні криві для визначення КК були отримані при різних концентраціях глюкози у розчині, які могли бути при розведенні зразків сироватки крові у 20 разів (рис. 27). Як видно з рисунку, чутливість біосенсора до КК зменшувалась із збільшенням концентрації глюкози. При концентраціях глюкози 0,1 мМ – 0,5 мМ можна було вимірювати активності КК від 0,01 од.акт./мл до 0,1 од.акт./мл. При концентрації глюкози 0,75 мМ чутливість біосенсора зменшувалась, і діапазон вимірювання КК зміщувався у бік більш високих концентрацій (0,06 од.акт./мл – 0,16 од.акт./мл). Таким чином, чутливості біосенсора було достатньо для того, щоб визначити, наскільки підвищений рівень КК у зразку при 20-кратному розведенні.

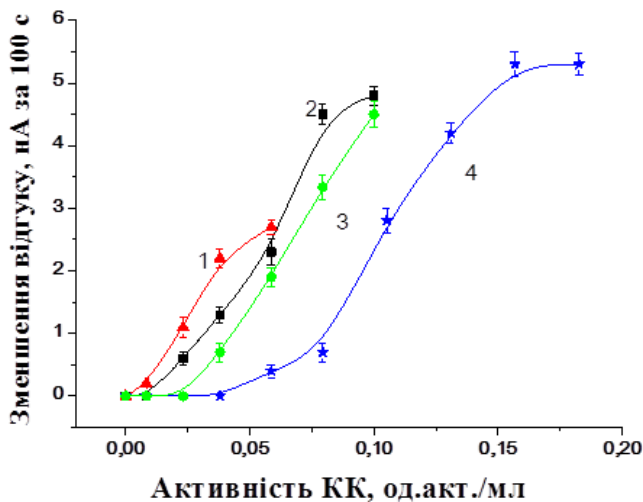


Рис. 27. Калібрувальні криві для визначення активності КК, отримані за різних концентрацій глюкози у вимірювальній комірці (1 – 0,1 мМ, 2 – 0,25 мМ, 3 – 0,5 мМ, 4 – 0,75 мМ)

При розробці наступного мультиферментного біосенсора для визначення концентрацій ЕДТА та цистеїну використовували ефекти реактивації попередньо заінгібованих ферментів. Першим етапом роботи було визначити необхідну

концентрацію сахарози як субстрату при інгібиторному аналізі. Для цього необхідно було вибрати таку концентрацію сахарози, за якої чутливість біосенсора до іонів важких металів буде максимальною. Теоретично оптимальна концентрація субстрату повинна знаходитися в області насичення ферменту субстратом, коли кожна з молекул ферментів максимально задіяна в процесах перетворення субстрату до кінцевого продукту, який призводить до зміни провідності і генерує максимальний відгук. При збільшенні концентрації сахарози до 1,0 мМ ми маємо класичний випадок незалежності рівня інгібування від концентрації субстрату (рис. 28). При подальшому збільшенні концентрації субстрату від 1,0 мМ до 1,5 мМ, починає зменшуватись рівень інгібування. Тому в подальших експериментах було вирішено використовувати концентрацію субстрату 1,25 мМ сахарози, при якій спостерігається найбільший відгук біосенсора на сахарозу та залишається ще досить високий рівень інгібування (чутливість до іонів важких металів).

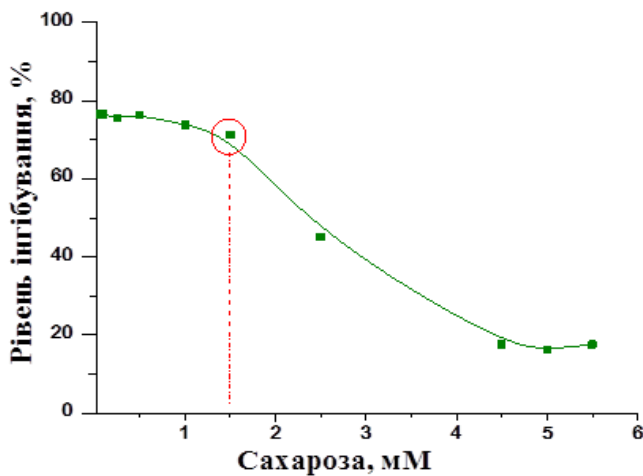


Рис. 28. Залежність рівня інгібування біосенсора на основі трьох ферментів від концентрації сахарози. Концентрація іонів ртуті 10 мкМ

Наступним важливим етапом розробки біосенсорів було дослідження залежності залишкової активності триферментної системи біосенсора від концентрації різних іонів важких металів. Калібрувальні криві біосенсора щодо визначення іонів різних важких металів представлено на рис. 29.

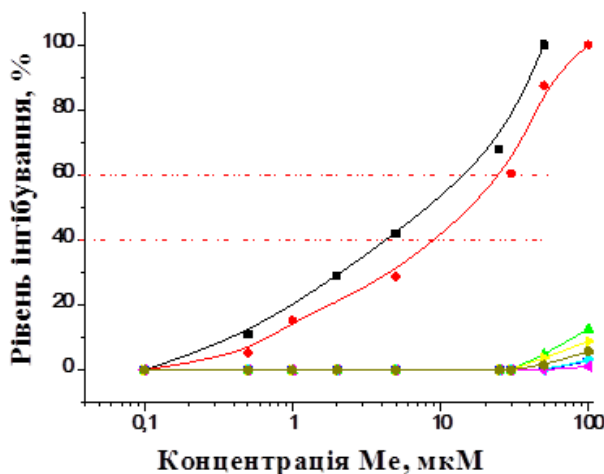


Рис. 29. Залежність рівня інгібування триферментної системи біосенсора від концентрації іонів Hg²⁺ (1), Ag⁺ (2), Cd²⁺ (3), Zn²⁺ (4), Ni²⁺ (5), Pb²⁺ (6), Cu²⁺ (7) та Co²⁺ (8)

Як видно з рисунку, найбільший вплив на активність ферментів мали іони Ag⁺ та Hg²⁺. Інші важкі метали при їх концентраціях до 100 мкМ лише незначною мірою впливали на роботу біосенсора. Аналізуючи отримані криві можна зробити висновок, що триферментний біосенсор на основі глюкозооксидази, інвертази та мутаротази може досить ефективно використовуватись для селективного аналізу

іонів ртуті та срібла, або для визначення загальної токсичності аналізованого зразку. Для подальших експериментів з реактивацією біосенсорів було вирішено використовувати концентрації металів, що інгібують біосенсори на рівні 40-60%.

Далі біосенсори, заінгібовані на 40-60%, реактивували різними концентраціями реактиваторів. Біосенсори, що інгібувались іонами ртуті, реактивували різними концентраціями цистеїну, а активність біосенсорів, інгібованих іонами срібла відновлювали різними концентраціями ЕДТА. Під час проведення даного експерименту використовували 1,25 мМ сахарозу як субстрат; 5 мкМ концентрацію іонів ртуті або 20 мкМ іонів срібла як інгібіторів, а біосенсори інгібувались до 55% та 60% залишкової активності, відповідно. Було побудовано калібрувальні криві біосенсора для визначення ЕДТА та цистеїну (рис. 30).

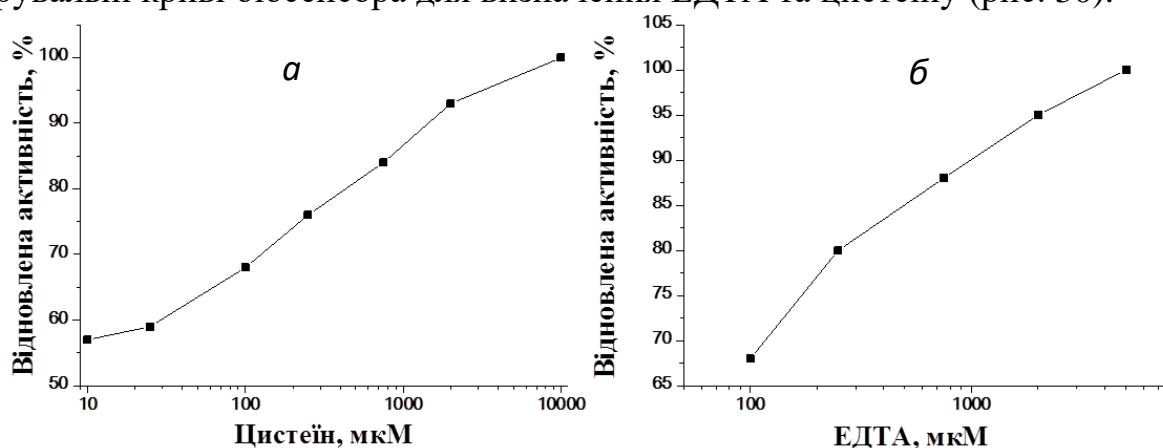


Рис. 30. Залежність відновлення активності триферментної системи біосенсора від концентрації цистеїну (*a*) та ЕДТА (*б*)

Отримані калібрувальні криві характеризувались не дуже широким лінійним діапазоном визначення, але було показано принципову можливість використання даного триферментного біосенсора для визначення ЕДТА та цистеїну. Змінювати чутливість триферментного біосенсора до ЕДТА та цистеїну можна, змінюючи початкові умови інгібування іонами металів.

Таким чином, було розглянуто різні варіанти розробки мультиферментних електрохімічних біосенсорів на основі каскадів ферментативних реакцій і конкурентних ферментативних реакцій для прямого визначення субстратів, та інші варіанти мультиферментних біосенсорів для не прямого аналізу речовин. Наведено низку прикладів успішних розробок варіантів мультиферментних біосенсорів та проведено аналіз їхніх переваг та недоліків.

Застосування мультиферментних біосенсорів для роботи з реальними зразками та верифікація отриманих результатів. Обов'язковим етапом дослідження було продемонструвати можливість аналізу реальних зразків з використанням розроблених мультиферментних біосенсорів та провести валідацію результатів аналізу традиційними методами визначення.

Для перевірки перспективності використання розробленого триферментного біосенсора на практиці було проведено аналіз зразків молока на наявність в них лактози. В якості контрольного методу використовували метод на основі високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). В ході експерименту за допомогою біосенсорного методу у п'яти повторах проаналізовано три зразки

коров'ячого молока (рис. 31). Як можна побачити з рисунка, концентрації лактози в молоці виміряні біосенсором, непогано корелювали з концентраціями, виміряними традиційним методом ВЕРХ. Коефіцієнт кореляції - 0,93. Відповідно лактозний біосенсор на основі трьох ферментів підходить для швидкого, селективного, недорогого, чутливого та простого визначення лактози в зразках молока.

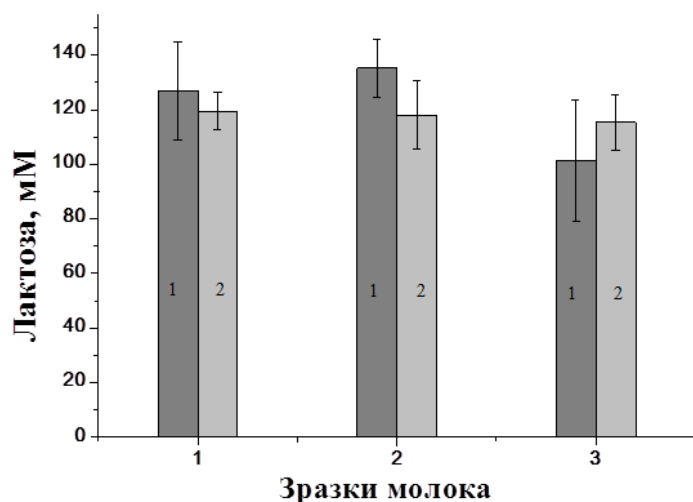


Рис. 31. Результати визначення концентрації лактози в зразках молока, отримані триферментним лактозним біосенсором (1) та методом ВЕРХ (2)

Розроблений в роботі двоферментний кондуктометричний біосенсор для визначення аргініну, за оптимальної його конструкції та з урахуванням оптимальних умов функціонування, було протестовано при визначенні концентрації аргініну у фармацевтичних зразках. Для біосенсорної перевірки концентрації аргініну було відібрано 6 препаратів: «Вейрон», «Тівомакс», «Глутаргін», «Тівортін», «Бетаргін», «Аміноплазмаль». Аналіз усіх препаратів проводили у 7-ми повторях. Результати наведено в таблиці 4, в якій виміряні концентрації аргініну в препаратах порівняно з концентраціями, зазначеними фармацевтичними підприємствами. Далі ми оцінили кореляцію між даними про концентрацію аргініну в лікарських засобах, виміряними біосенсором та заявленими виробниками. Коефіцієнт кореляції склав 0,989.

Таблиця 4

Порівняння результатів біосенсорного аналізу аргініну в фармпрепаратах з даними, вказаними виробниками

Назва препарату	Концентрація аргініну, вказана виробником, мМ	Виміряна концентрація аргініну, мМ
«Вейрон»	1050	1026 ± 153
«Тівомакс»	200	238 ± 31
«Глутаргін»	70	66 ± 19
«Бетаргін»	270	262 ± 46
«Тівортін»	654	665 ± 49
«Аміноплазмаль»	66	84 ± 26

З використанням триферментного біосенсора для визначення сахарози та моноферментного біосенсора для визначення глюкози було проаналізовано 10 зразків фруктових та овочевих соків і нектарів та 2 зразки меду. Методом контролю було обрано високоефективну рідинну хроматографію з подальшою рефрактометричною детекцією, адже відомо, що цей метод характеризується

високою точністю, а результати, одержані ним, можна вважати достовірними. Результати визначення концентрацій глюкози та сахарози в напоях, отримані біосенсорним методом та контрольним методом були досить близькими між собою та мали високу кореляцію даних ($R = 0,990$), що відображено на рис. 32. Це свідчить про широкі перспективи використання в майбутньому таких систем для аналізу харчових продуктів на наявність в них відповідних концентрацій сахарози та глюкози, які є дуже важливими показниками харчової цінності продукту, а також в багатьох випадках можуть напряму, або опосередковано говорити про фальсифікацію продукту (фальсифікація соків, меду додаванням цукру тощо).

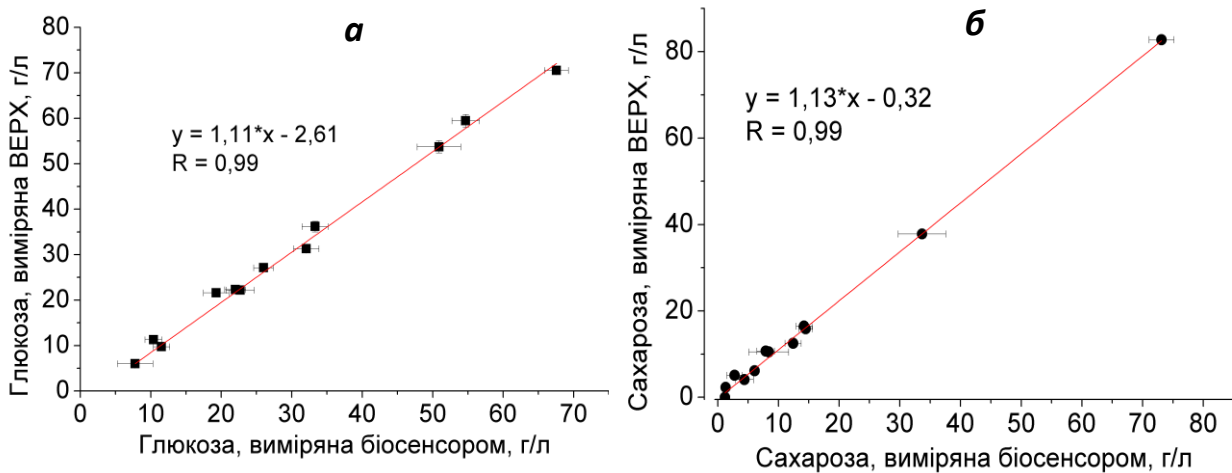


Рис. 32. Кореляція результатів визначення глюкози (а) та сахарози (б) за допомогою мультиферментного біосенсора і ВЕРХ

З метою перевірки працездатності біосенсора для аналізу іонів важких металів, в ряді водоймищ м. Києва було відібрано проби води. В кілька зразків було штучно додано відому кількість іонів важких металів для перевірки, на скільки збільшиться рівень інгібування біосенсора, і як це відповідає реальним концентраціям відповідного важкого металу. Також було перевірено перспективність використання розробленого біосенсора при аналізі багатокомпонентних складних зразків. Для аналізу було взято водні зразки з полігону побутових відходів. Для контролю результатів біосенсорного аналізу усі використані в роботі зразки також були протестовані в Інституті екогігієни та токсикології ім. Л.І. Медведя (табл. 5).

Таблиця 5

Порівняння результатів аналізу водних зразків різними методами

Метод аналізу	Реальні зразки з водойм									
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10
АААНг ²⁺ , мкМ	0	0,405 (Hg ²⁺)	0	0	0	0	0	0	0	0
ААС, мкМ	0	0	0	0	24,87 (Ag ⁺)	0	0	0	0	4,99(Cu ²⁺) 0,576(Co ²⁺) 22,5(Zn ²⁺) 19(Cr ²⁺)
Сенсор, мкМ	0	+	0	0	+	0	0	0	0	++

Примітки: 1 - АААНг²⁺ - атомно-абсорбційний аналізатор ртуті; 2 - ААС – атомно-абсорбційна спектроскопія; 3 - «+» - перевищення ГДК; 4 - «+++» - перевищення ГДК на декілька порядків.

Для моніторингу секреції глутамату астроцитами під час їх механічної стимуляції було застосовано мікробіосенсор на основі двох ферментів чутливий до L-глутамату. Для контролю селективності отриманого сигналу був застосований контрольний сенсор аналогічної конструкції, при виготовленні якого глутаматоксидаза була замінена на БСА. Мікробіосенсор, чутливий до глутамату, та контрольний сенсор були розташовані на одному рівні над шаром астроцитів, в безпосередній близькості від поверхні клітин але без контакту з останніми. Відстань між мікробіосенсором чутливим до L-глутамату та контрольним сенсором складала близько 100 мкм. Далі було застосовано механічну стимуляцію клітин астроцитів шляхом торкання поверхні клітин кінцем скляної мікропіпетки. Механічна стимуляція астроцитів призводила до секреції L-глутамату клітинами. Отримані результати реакцій біосенсора чутливого до L-глутамату та контрольного сенсора представлено на рис. 33.

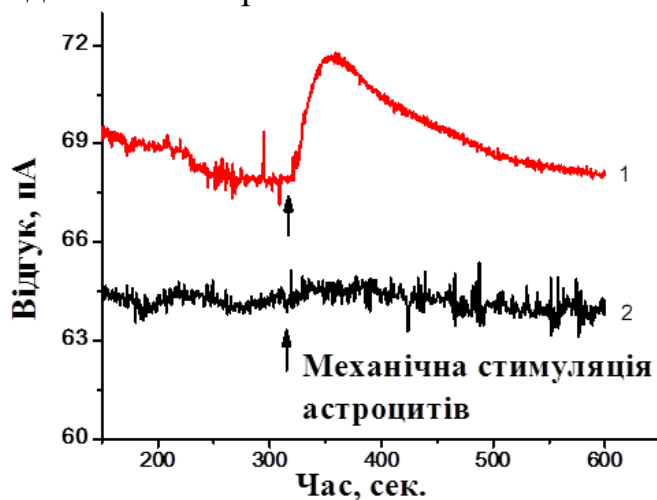


Рис. 33. Експериментальні дані щодо біосенсорного моніторингу секреції L-глутамату *in vitro* клітинами астроцитів у культурі (1- біосенсор чутливий до L-глутамату та 2 – контрольний сенсор)

Як видно з рис. 33, механічна стимуляція активності клітин астроцитів, що була проведена після стабілізації відгуку обох сенсорів, призвела до швидкого збільшення сигналу двоферментного біосенсора чутливого до L-глутамату. В той же час, зміни сигналу контрольного сенсора не було зафіксовано.

Таким чином, було успішно продемонстровано селективний моніторинг *in vitro* рівня глутамату за допомогою двоферментного мікробіосенсора на прикладі культури астроцитів.

Апробацію розробленої біосенсорної системи для визначення глюкози, АТФ та активності КК було вирішено провести шляхом визначення зазначених речовин в зразках крові, отриманих від пацієнтів. Для моделювання різних станів пацієнта і перевірки роботи біосенсорної системи в широкому діапазоні концентрацій речовин до зразків було додано різні кількості АТФ та КК. В якості контрольного методу визначення використовувався метод спектрофотометрії. Отримані результати наведені на рис. 34. Точність визначення концентрації глюкози біосенсорною системою була найвищою, оскільки при цьому використовується прямий ферментний аналіз на основі одного ферменту. Кореляція між результатами визначення глюкози біосенсорною системою і контрольним методом аналізу була 0,975. Точність визначення АТФ біосенсорною системою була дещо гіршою, оскільки процедура визначення АТФ є більш складною і включає в себе дві конкуруючі ферментативні реакції. Втім, кореляція між результатами визначення

концентрацій АТФ біосенсорною системою і контрольним методом аналізу була задовільною – 0,912. Визначення активності КК біосенсорною системою проводиться подібно до визначення АТФ, але включає в себе ще одну ферментативну реакцію, що погіршує точність вимірювання. Кореляція між результатами визначення активності КК біосенсорною системою і контрольним методом аналізу (R^2) була 0,886.

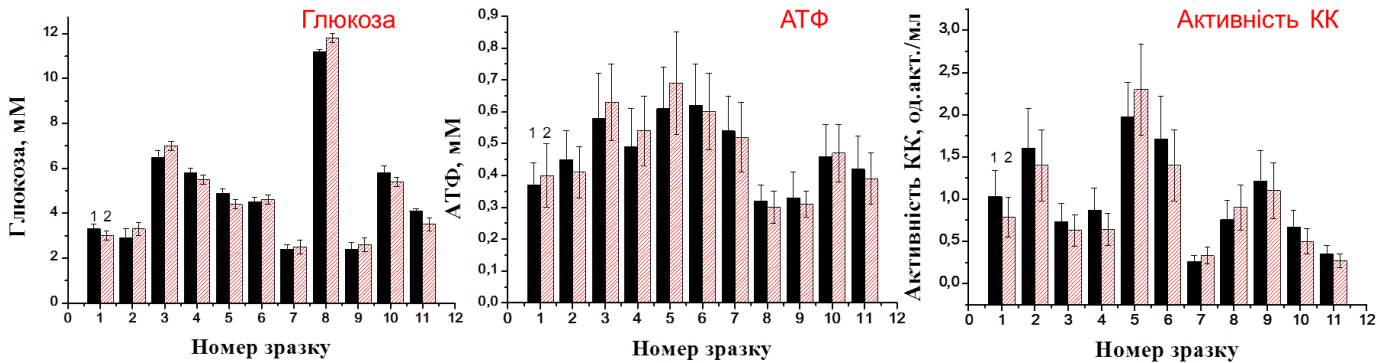


Рис. 34. Порівняння результатів визначення глюкози, АТФ та активності КК в зразках сироватки крові біосенсорним (1) та контрольним методом (2)

Таким чином, з використанням створених лабораторних прототипів мультиферментних біосенсорів проведено аналіз низки реальних біологічних, фармацевтичних та екологічних зразків. Проведено верифікацію отриманих біосенсорних даних традиційними методами аналізу та показано високий рівень кореляції отриманих результатів.

В ході виконання даної дисертаційної роботи було створено цілу низку лабораторних прототипів мультиферментних біосенсорів. Спираючись на досвід та враховуючи труднощі, що виникали в процесі роботи, було запропоновано покрокову методику розробки мультиферментних електрохімічних біосенсорів. Схема цієї методики приведена на рис. 35.

За умов покрокового використання запропонованої методики можна розробити мультиферментний біосенсор на основі різних варіантів поєднання ферментативних реакцій та для будь-яких потреб життєдіяльності людини. В результаті використання розробленої методики буде отримано діючий лабораторний прототип мультиферментного біосенсора, що може бути основою для створення промислового зразку відповідного біосенсора.

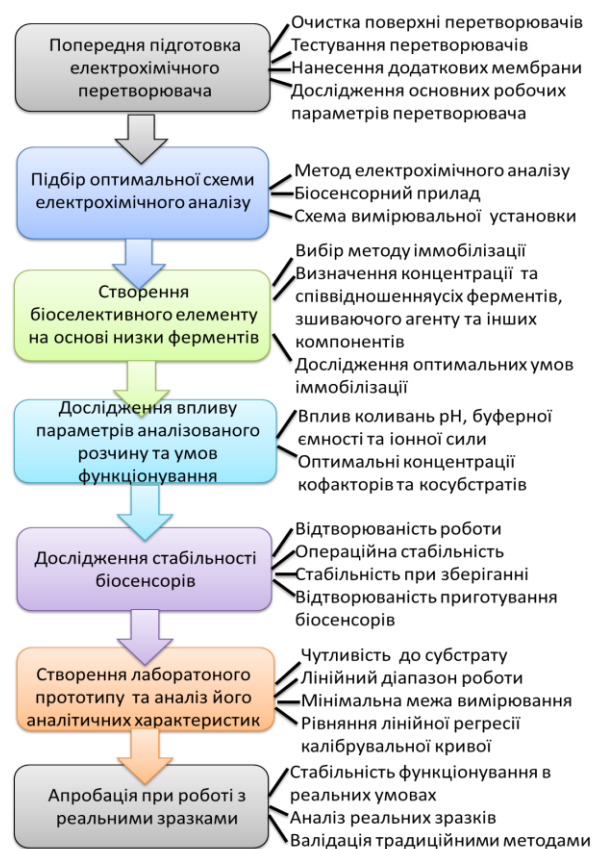


Рис. 35. Схема методики розробки мультиферментних біосенсорів

ВИСНОВКИ

Науково обґрунтовано та розроблено фундаментальні та технологічні основи створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів для практичного застосування в медичній діагностиці, охороні навколишнього середовища, сільському господарстві, для контролю якості продуктів харчування та перебігу біотехнологічних процесів на виробництві.

1. Розроблено нові методики тестування електрохімічних перетворювачів для оцінки основних аналітичних характеристик, таких як чутливість, селективність та стабільність з метою подальшого їхнього використання при створенні мультиферментних біосенсорів з необхідними характеристиками.

2. Запропоновано нові алгоритми вибору оптимальних вимірювальних приладів та схем електрохімічного аналізу для покращення ефективності функціонування мультиферментних біосенсорів.

3. Показана перспективність створення низки бі- та триферментних біосенсорів на основі каскадів ферментативних реакцій для прямого визначення субстратів (лактоза, аргінін, мальтоза, ацетилхолін) та визначено переваги та недоліки даного типу біосенсорів. Розроблені біосенсиори для визначення відповідних речовин мають наступні аналітичні характеристики:

- Лактоза: мінімальна границя визначення – 10 мкМ; чутливість – 6,8 мкСм/мМ; лінійний діапазон роботи – 0,01 -0,75 мМ.

- Аргінін: мінімальна границя визначення – 1 мкМ; чутливість - 23,4 мкСм/мМ; лінійний діапазон роботи – 0,025-0,5 мМ.

- Мальтоза: мінімальна границя визначення – 1 мкМ; чутливість – 12,55 мкСм/мМ; лінійний діапазон роботи – 0,25-1,5 мМ.

- Ацетилхолін: мінімальна границя визначення – 3,8 мкМ; чутливість - 98 нА/мМ; лінійний діапазон роботи – 10-200 мкМ.

4. Перевірено доцільність розробки біосенсорів на основі конкуренції кількох ферментів за субстрат (визначення концентрацій АТФ, глутамату) та проаналізовано особливості функціонування мультиферментних біосенсорів такого типу. Розроблені біосенсиори для визначення відповідних речовин мають наступні аналітичні характеристики:

- АТФ: мінімальна границя визначення – 2,5 мкМ; чутливість – 2,3 нА/мМ; лінійний діапазон роботи – 2,5-20 мкМ.

- Глутамат: мінімальна границя визначення – 2,5 мкМ; чутливість – 100 нА/мМ; лінійний діапазон роботи – 5-20 мкМ.

5. Розроблено низку біосенсорів на основі мультифункціонального використання ферментів для непрямого аналізу речовин (інгібіторне визначення, ефекти реактивації ферментів, визначення активності ферментів) та оцінено перспективність таких варіантів біосенсорів. Розроблені біосенсиори для визначення відповідних речовин мають наступні аналітичні характеристики:

- Іони важких металів: мінімальна границя визначення – 0,5 мкМ; лінійний діапазон роботи – 0,5-100 мкМ; час інгібування - 30 хв.

- ЕДТА: мінімальна границя визначення – 100 мкМ; лінійний діапазон роботи – 0,1-5 мМ; час реактивації - 45 хв.

- Цистеїн: мінімальна границя визначення – 10 мкМ; лінійний діапазон роботи – 0,01-10 мМ; час реактивації - 45 хв.
 - активність КК: мінімальна границя визначення – 0,01 од.акт./мл; чутливість – 4,5 нА за 100с. на 0,1 од.акт./мл; лінійний діапазон роботи – 0,01 од.акт./мл до 0,1 од.акт./мл.
6. Створено діючі лабораторні прототипи низки амперометричних та кондуктометричних біосенсорів на основі різних варіантів роботи мультиферментних біоселективних елементів (каскади ферментативних реакцій, конкуренція за субстрат, інгібіторний аналіз, визначення реактиваторів тощо). З урахуванням отриманого масиву даних запропоновано узагальнюючі технологічні схеми виготовлення біосенсорних пристроїв на основі мультиферментних біоселективних елементів. Для низки розроблених біосенсорів (визначення ацетилхоліну, глюкози, лактози, мальтози, аргініну, АТФ, ЕДТА, цистеїну та активності креатинкінази) виконано ряд метрологічних досліджень, які затверджено в ДП «Укрметртестстандарт».
7. Створені лабораторні прототипи мультиферментних біосенсорів апробовано при аналізі низки реальних біологічних, фармацевтичних, харчових та екологічних зразків. Проведено верифікацію отриманих даних традиційними методами аналізу та показано високий рівень кореляції отриманих результатів.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Schuvailo O.M., **Soldatkin O.O.**, Lefebvre A., Cespuglio R., Soldatkin A.P. Highly selective microbiosensors for *in vivo* measurement of glucose, lactate and glutamate. *Analytica Chimica Acta*. 2006. Vol. 573-574. P. 110-116. *(Особистий внесок здобувача: розробка амперометричного біосенсора на основі двох ферментів для визначення глутамату).*
2. Мельник В.Г., Василенко А.Д., Медведенко М.П., Михаль А.А., **Солдаткин А.А.**, Исследование информативных параметров дифференциальных кондуктометрических биосенсоров. *Технічна електродинаміка. Тем. Випуск 2006. Частина 3. С. 119-124. (Особистий внесок здобувача: дослідження впливу інформаційних параметрів на роботу сенсорів).*
3. Пешкова В.М., **Солдаткін О.О.**, Дзядевич С.В. Оптимізація методики визначення сахарози в соках і солодких напоях кондуктометричним ферментним біосенсором. *Біополімери і клітина. 2007.Т. 23. № 6. С.501-510. (Особистий внесок здобувача: використання біосенсора для визначення сахарози в напоях).*
4. **Солдаткін О.О.**, Пешкова В.М., Дзядевич С.В., Єльська Г.В. Кондуктометричний біосенсор на основі триферментної системи для визначення сахарози. *Біотехнологія. 2008. Т.1. №1. С.116-122. (Особистий внесок здобувача: розробка сахарозного біосенсора на основі коїммобілізації трьох ферментів).*
5. **Soldatkin O.O.**, Schuvailo O.M., Marinesco S., Cespuglio R., Soldatkin A.P. Microbiosensor based on glucose oxidase and hexokinase co-immobilised on platinum microelectrode for selective ATP detection. *Talanta*. 2009. Vol. 78. P. 1023-1028. *(Особистий внесок здобувача: розробка мікробіосенсора для визначення концентрації АТФ).*

6. Пешкова В.М., Саяпіна О.Я., **Солдаткін О.О.**, Кукла О.Л., Дзядевич С.В. Ферментний кондуктометричний біосенсор для визначення лактози. Біотехнологія. 2008. Т.1. № 4. С. 76-84 (*Особистий внесок здобувача: оптимізація роботи біосенсора для визначення лактози*).
7. Пешкова В.М., Саяпіна О.Я., **Солдаткін О.О.**, Дзядевич С.В. Ферментний кондуктометричний біосенсор для визначення мальтози, *Biopolymers and Cell*. 2009. Vol. 25. № 4. P. 272-278. (*Особистий внесок здобувача: Розробка триферментного біосенсора та дослідження його аналітичних характеристик*).
8. Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P., **Soldatkin A.A.**, Peshkova V.N., Vasilenko A.D., Melnik V.G., Mikhal A.A., Semenycheva L.N., Rubanchuk M.P. Four-channel biosensor analyzer of saccharides. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2009. Vol. 3. С. 47-53. (*Особистий внесок здобувача: оптимізація функціонування кондуктометричної біосенсорної системи для мультианалізу дисахаридів*).
9. Кучеренко І.С., **Солдаткін О.О.**, Пешкова В.М., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Оптимізація кондуктометричного триензимного біосенсора для визначення іонів важких металів. Біотехнологія. 2009. Т.2. № 3, С. 86-93. (*Особистий внесок здобувача: дослідження параметрів роботи біосенсора на основі інгібіторного визначення іонів важких металів*).
10. **Солдаткін О.О.**, Щувайло О.М., Сеспугліо Р., Солдаткін О.П. Розробка високочутливого та селективного амперометричного перетворювача для створення *in vivo* біосенсорів. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2010. Т.1(7), № 2. С. 51-60. (*Особистий внесок здобувача: розробка мікроелектродів для in vivo визначення концентрацій нейромедіаторів*).
11. Пешкова В.М., Саяпіна О.Я., **Солдаткін О.О.**, Дзядевич С.В. Традиційні та біосенсорні методи визначення моно- та дисахаридів. Біотехнологія. 2010. Т.3. № 3. С. 9-22 (*Особистий внесок здобувача: дослідження, аналіз та систематизація усіх відомостей стосовно розробки електрохімічних біосенсорів для визначення сахаридів*).
12. **Soldatkin O.O.**, Kucherenko I.S., Pyeshkova V.M., Kukla A.L., Jaffrezic-Renault N., El'skaya A.V., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P. Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions, *Bioelectrochemistry*. 2012. Vol. 83. P. 25-30. (*Особистий внесок здобувача: розробка біосенсора для інгібіторного визначення іонів важких металів*).
13. **Солдаткін О.О.** Оптимізація одночасної роботи трьох мікробіосенсорів для мультианалізу глюкози лактату та глютамату. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2012. Т.3 (3), № 3. С. 53-62. (*Особистий внесок здобувача: створення мультибіосенсора для одночасного визначення глюкози лактату та глютамату*).
14. **Soldatkin O.O.**, Peshkova V.M., Saiapina O.Y., Kucherenko I.S., Dudchenko O.Y., Melnik V.G., Vasylenko O.D., Semenycheva L.M., Soldatkin A.P., Dzyadevych S.V. Development of conductometric biosensor array for simultaneous determination of maltose, lactose, sucrose and glucose. *Talanta*. 2013. Vol. 115. P. 200-207. (*Особистий внесок здобувача: проектування та розробка кондуктометричної мультибіосенсорної системи для визначення сахаридів*).
15. Soldatkin A.P., Dzyadevych S.V., Korpan Y.I., Sergeyeva T.A., Arkhypova V.N., Biloivan O.A., **Soldatkin O.O.**, Shkotova L.V., Zinchenko O.A., Peshkova V.M.,

Saiarina O.Y., Marchenko S.V., El'skaya A.V. Biosensors. A quarter of a century of R&D experience. *Biopolymers and Cell*. 2013. Vol. 29. № 3. P. 188-206. *(Особистий внесок здобувача: розробка нових методик іммобілізації ферментів для створення біосенсорних систем)*.

16. Пешкова В.М., Кучеренко І.С., **Солдаткін О.О.**, Дзядевич С.В. Методика тестування та оптимізації амперометричних перетворювачів. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2013. Т.10, № 3. С. 88-98. *(Особистий внесок здобувача: проектування та створення методики тестування амперометричних перетворювачів)*.

17. Дудченко О.Є., Мацишин М.Й., В.М. Пешкова, **Солдаткін О.О.**, Солдаткін О.П., Дзядевич С.В. Методика тестування кондуктометричних перетворювачів для подальшого біосенсорного використання. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2013. Т.10. № 4. С. 97-109. *(Особистий внесок здобувача: проектування та створення процедури тестування кондуктометричних перетворювачів на диференційність та чутливість до зміни провідності)*.

18. Кучеренко І.С., **Солдаткін О.О.**, Дідух Д.Ю., Солдаткін О.П. Характеристики та оптимальні умови роботи амперометричного біосенсора для визначення аденозинтрифосфорної кислоти. *Biotechnologia acta*. 2014. Vol. 7. № 1. P. 66-74. *(Особистий внесок здобувача: дослідження основних аналітичних характеристик біоферментного біосенсора для визначення АТФ)*.

19. Кучеренко І.С., Яковлева О.С., **Солдаткін О.О.**, Мельник В.Г., Семеничева Л.М., Солдаткін О.П., Дзядевич С.В. Дослідження аналітичних характеристик амперометричних нікелевих перетворювачів за допомогою потенціостату "Palmsens" та його вітчизняного аналогу. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2014. Т.11. № 1. С. 42-52. *(Особистий внесок здобувача: створення методики порівняння потенціостатів для проведення амперометричних досліджень)*.

20. Kucherenko I.S., Didukh D.Yu., **Soldatkin O.O.**, Soldatkin A.P. Amperometric biosensor system for simultaneous determination of adenosine-5'-triphosphate and glucose. *Analytical Chemistry*. 2014. Vol. 86. P. 5455-5462. *(Особистий внесок здобувача: оптимізація біосенсорної системи для визначення АТФ та глюкози)*.

21. Пешкова В.М., Дудченко О. Є., **Солдаткін О.О.**, Дзядевич С.В. Біосенсори для визначення деяких найпоширеніших вуглеводів. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2014. Т.11. № 4. С. 81-96. *(Особистий внесок здобувача: узагальнення результатів створення амперометричних та кондуктометричних біосенсорів для визначення сахарів)*.

22. Pyeshkova V.N., Dudchenko O.Y., **Soldatkin O.O.**, Kasap B. O., Lagarde F., Akata B., Dzyadevych S.V. Application of silicalite-modified electrode for the development of sucrose biosensor with improved characteristics. *Nanoscale Research Letters*. 2015. Vol. 10. Art. №. 149. *(Особистий внесок здобувача: Розробка методики іммобілізації трьохферментної системи на основі адсорбції ферментів на цеоліті)*.

23. Kucherenko I., **Soldatkin O.**, Lagarde F., Jaffrezic-Renault N., Dzyadevych S., Soldatkin A.P. Determination of total creatine kinase activity in blood serum using an amperometric biosensor based on glucose oxidase and hexokinase, *Talanta*. 2015. Vol.

144. P. 604-611. *(Особистий внесок здобувача: дослідження основних параметрів роботи біосенсора для визначення активності креатинкінази в розчині).*
24. Kucherenko I.S, Kucherenko D.Y, **Soldatkin O.O.**, Lagarde F., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P. A novel conductometric biosensor based on hexokinase for determination of adenosine triphosphate. *Talanta*. 2016. Vol. 150. P. 469-475. *(Особистий внесок здобувача: створення моно ферментного біосенсора для визначення АТФ).*
25. Kucherenko D.Y, Siediuko D.V., Knyzhnykova D.V., **Soldatkin O.O.**, Soldatkin A.P. Development of amperometric biosensor for choline determination. *Biopolymers and Cell*. 2016.Vol. 32. № 3. P. 229-234. *(Особистий внесок здобувача: створення та аналіз основних аналітичних характеристик біосенсора для визначення холіну).*
26. Кучеренко Д.Ю., Сєдюко Д.В., Книжникова Д.В., Кучеренко І.С., **Солдаткін О.О.**, Солдаткін О.П. Оптимізація холін-чутливого біосенсора для роботи в біологічних рідинах. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2016. Т.13. № 4 С. 50-60. *(Особистий внесок здобувача: оптимізація основних параметрів функціонування біосенсора для визначення холіну).*
27. **Солдаткін О.О.**, Приліпко В.О., Куйбіда М.А., Хоменко І.І., Солдаткін О.П., Дзядевич С.В. Розробка нового біосенсора для визначення аргініну в фармацевтичних препаратах. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2017. Т.14. № 2. С. 74-87. *(Особистий внесок здобувача: дослідження впливу параметрів розчину на функціонування біосенсора для визначення аргініну).*
28. Soldatkina O.V., Kucherenko I.S., Pyeshkova V.M., Alekseev S.A., **Soldatkin O.O.**, Dzyadevych S.V. Improvement of amperometric transducer selectivity using nanosized phenylenediamine films. *Nanoscale Research Letters*. 2017.Vol. 12. Art. №.594. *(Особистий внесок здобувача: дослідження параметрів нанесення додаткової мембрани на основі полі-т-фенілендіаміну).*
29. Книжникова Д.В., Кучеренко І.С., **Солдаткін О.О.** Розробка амперометричного біосенсора для визначення ацетилхоліну в біологічних зразках. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2018. Т.15. № 2. С. 28-38. *(Особистий внесок здобувача: розробка двоферментного біосенсора для визначення концентрації ацетилхоліну).*
30. Кучеренко Д.Ю., Кучеренко І.С., **Солдаткін О.О.**, Топольнікова Я.В., Книжникова Д.В., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Масив ферментних біосенсорів для визначення концентрацій нейротрансмітерів та метаболітів. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2018. Т.15. № 2. С. 39-53. *(Особистий внесок здобувача: розробка методики мультибіосенсорного аналізу низки аналітів в біологічних зразках).*
31. Soldatkina O.V., **Soldatkin O.O.**, Velychko T.P., Prilipko V.O., Kuibida M.A., Dzyadevych S.V. Conductometric biosensor for determination in pharmaceuticals, *Bioelectrochemistry*. 2018. Vol. 124. P. 40-46. *(Особистий внесок здобувача: обґрунтування біосенсорної методики визначення аргініну в фармацевтичних зразках).*
32. Пешкова В.М., **Солдаткін О.О.**, Дзядевич С.В., Солдаткін О.П. Кондуктометрична біосенсорна система для визначення концентрації лактози в розчині: патент України на корисну модель № 36831; заявл. 15.05.2008, опубл. 10.11.2008, Бюл №. 21. 8с. *(Особистий внесок здобувача: оптимізація основних*

параметрів функціонування кондуктометричного біосенсора для визначення лактози).

33. Пешкова В.М., Саяпіна О.Я., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В. Кондуктометрична біосенсорна система для визначення концентрації мальтози у розчині: патент України на корисну модель № 43335; заявл. 27.03.2009, опубл. 10.08.2009, Бюл № 1. 8с. (*Особистий внесок здобувача: адаптація та оптимізація основних параметрів роботи біосенсора для визначення мальтози*).

34. Кучеренко І.С., Солдаткін О.О., Солдаткін О.П., Єльська Г.В. Портативна амперометрична біосенсорна система для визначення концентрації аденозин-5'-трифосфату та глюкози у розчині: патент України на корисну модель № 78106; заявл. 17.08.2012, опубл. 11.03.2013, Бюл № 5. 9с. (*Особистий внесок здобувача: вивчення параметрів одночасної роботи біферментного біосенсора для визначення АТФ та моноферментного біосенсора для визначення глюкози*).

35. Кучеренко І.С., Кучеренко Д.Ю., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В. Солдаткін О.П. Аката Курч Б. Кондуктометричний біосенсор для визначення аденозин-5'-трифосфату: патент України на корисну модель № 103744; заявл. 09.07.2015, опубл. 25.12.2015, Бюл № 24. 7с. (*Особистий внесок здобувача: вивчення основних параметрів роботи біферментного біосенсора для визначення АТФ*).

36. Кучеренко І.С., Кучеренко Д.Ю., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В. Солдаткін О.П., Касап Б.О., Кірдецілер С.К., Аката Курч Б. Кондуктометричний біосенсор на основі гексокінази для визначення концентрації аденозин-5-трифосфату у водних розчинах: патент України на винахід № 112141; заявл. 09.07.2015, опубл. 25.01.2016, Бюл № 14. 8с. (*Особистий внесок здобувача: дослідження основних аналітичних характеристик моноферментного біосенсора для визначення концентрації АТФ*).

37. Schuvailo O.M., Soldatkin O.O., Cespuglio R., Soldatkin A.P. Highly selective microbiosensors for *in vivo* measurement of glucose, lactate and glutamate: Int. Conf. Instrumental Methods of Analysis. Modern Trends and Applications (Iraklion, 2-6 October 2005). Iraklion, Crete, Greece, 2005. P. 495.

38. Мельник В.Г., Василенко А.Д., Медведенко М.П., Михаль А.А., Солдаткин А.А. Об оптимизации конструкции и режима работы кондуктометрических биосенсоров: тези 2-ї Міжнародної науково-технічної конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, 26-30 червня 2006 р) Одеса, 2006. С.143.

39. Schuvailo O.M., Soldatkin O.O., Cespuglio R., Soldatkin A.P. Microbiosensors based on rutenised carbon fiber electrodes for selective measurement of glucose, lactate and glutamate *in vivo*: тези 2-ї Міжнародної науково-технічної конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, 26-30 червня 2006 р.). Одеса, 2006. С. 176.

40. Солдаткін О.О., Пешкова В.М., Дзядевич С.В., Єльська Г.В. Кондуктометричний біосенсор для визначення цукрози: тези 2-ї Міжнародної науково-технічної конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, 26-30 червня 2006 р.). Одеса, 2006.С. 180.

41. Soldatkin A.P., Schuvailo O.M., Soldatkin O.O., Marinesco S., Cespuglio R. Amperometric microbiosensors for neurotransmitters detection *in vivo*: Ukrainian-German Symposium on Nanobiotechnology (Kyiv, 14-16 December 2006) Kyiv, 2006. P. 142.

42. Schuvailo O.M., Marinesco S., **Soldatkin O.O.**, Cespuglio R., Soldatkin A.P. Development of highly selective microbiosensor for *in vivo* measurements of glucose, lactate, glutamate and D-serine: Les materiaux et leurs applications aux dispositifs capteurs (Tunisie, 30 October – 1 Novembre 2006) Tunisie, 2006. P. 38.
43. **Soldatkin O.O.**, Peshkova V.N. Multienzyme conductometric biosensor for direct analysis of sucrose and inhibitory determination of heavy-metal ions: Conference of Young Scientists dedicated to the 185th anniversary of Gregor Mendel (Kiev, 13-14 April 2007). Kiev, Ukraine, 2007. P. 284.
44. Peshkova V.N., **Soldatkin O.O.**, El'skaya A.V., Soldatkin A.P., Dzyadevych S.V. Adaptation of biosensor bioselective element for sucrose determination in beverages: International conference "Functional Materials" (Partenit, 2-7 October 2007) Partenit, Crimea, Ukraine, 2007. P. 484.
45. Пешкова В.М., **Солдаткін О.О.**, Дзядевич С.В. Оптимізація аналітичних характеристик сахарозного кондуктометричного біосенсору: тези наукової конференції «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології - 2007» (Київ 7-8 червня 2007 р) Київ, 2007. С. 131.
46. Щувайло О.М., **Солдаткін О.О.**, Марінеско С., Сеспугліо Р., Солдаткін О.П. Розробка мікробіосенсора, чутливого до АТФ, з використанням глюкозооксидази та гексокінази: 3 Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса 2-6 червня 2008р) Одеса, 2008. С. 231.
47. **Солдаткін О.О.**, Пешкова В.М., Архіпова В.М., Єльська Г.В. Розробка кондуктометричного біосенсора на основі триферментної системи для визначення іонів важких металів: тези 3-ї Міжнародної науково-технічної конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, 2-6 червня 2008р) Одеса, 2008. С. 236.
48. Peshkova V.M., Saiarina O.Y., **Soldatkin O.O.**, El'skaya A.V., Soldatkin A.P., Dzyadevych S.V. Development of enzyme conductometric biosensors for determination of glucose, sucrose and lactose: Bridges in life sciences annual scientific review (Zagreb 4 October 2008) Zagreb, Croatia, 2008. P. 80.
49. Пешкова В.М., Кучеренко І.С., **Солдаткін О.О.**, Дзядевич С.В. Використання кондуктометричного біосенсора на основі триферментної системи для дослідження токсичності водних зразків побутових відходів: тези Міжнародної наукової конференції «Фізичні методи в екології біології та медицині» (Львів, 3-7 вересня 2008 р) Львів, 2008. С. 50-51.
50. Peshkova V., Saiarina O., **Soldatkin O.**, Melnik V., Dzyadevych S. Development of enzyme multibiosensor for carbohydrates determination: Bridges in life sciences annual scientific review (Debrecen 4 April 2009) Debrecen, Hungary 2009. P. 121.
51. Кучеренко І.С., **Солдаткин А.А.**, Пешкова В.Н., Дзядевич С.В. Адаптація біосенсора на основе трех ферментов для ингибиторного анализа тяжелых металлов: тези 9-ї Всеукраїнської наукової конференції студентів та молодих науковців "Біологічні дослідження молодих учених в Україні" (Київ, 28-29 жовтня 2009 р.) Київ, 2009. С. 143-144.
52. Peshkova V.M., Saiarina O.Y., **Soldatkin O.O.**, Dzyadevych S.V. Development of biosensor for maltose determination: International Conference "Functional Materials" (Partenit, 2-7 October 2009) Partenit, Crimea, Ukraine, 2009. P. 422.

53. **Солдаткін О.О.**, Щувайло О.М., Сеспугліо Р., Солдаткін О.П. Розробка універсального амперометричного перетворювача для *in vivo* біосенсорів: тези 4-ї Міжнародної науково-технічної конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, 28 червня – 2 липня 2010 р.) Одеса, 2010. С. 222.
54. **Солдаткін О.О.**, Щувайло О.М., Сеспугліо Р., Солдаткін О.П. Розробка мікробіосенсора для визначення АТФ: тези 10-го Українського Біохімічного з'їзду (Одеса, 13-17 вересня 2010 р.) Одеса, 2010. С. 311.
55. **Soldatkin O.**, Kucherenko I., Peshkova V., Jaffrezic-Renault N., El'skaya A., Dzyadevych S., Soldatkin A. Multienzyme conductometric biosensor for inhibitory determination of heavy-metal ions in real water samples: Les matériaux et leurs applications aux dispositifs capteurs (Tabarka, 20-26 October 2010) Tabarka, Tunisie. P. 48.
56. Peshkova V.M., **Soldatkin O.O.**, Mikhal A.A., Melnik V.G., Dzyadevych S.V. Enhancement of analytical characteristics of enzyme multibiosensor for simultaneous carbohydrates determination: 6-th annual scientific meeting regional cooperation for health, science and technology (Bratislava, 8-10 April 2011) Bratislava, Slovak republic, 2011. V.27. №. 2. P. 59.
57. Дідух Д.Ю., Кучеренко І.С., **Солдаткін О.О.**, Солдаткін О.П. Розробка амперометричного біосенсора для селективного визначення АТФ: тези 11-ї Міжнародної наукової конференції «Шевченківська весна 2013» (Київ, 20-22 березня, 2013 р.) Київ, 2013. С. 190-191.
58. Дідух Д.Ю., Кучеренко І.С., **Солдаткін О.О.**, Солдаткін О.П. Розробка масиву біосенсорів для одночасного визначення глюкози та АТФ, тези 2-гої всеукраїнської науково-практичної конференції «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 16-17 травня 2013 р.) Київ, 2013. С. 84.
59. Peshkova V.M., Kucherenko I.S., **Soldatkin O.O.**, Dzyadevych S.V. Testing method of amperometric transducers for development of biosensors based on enzymes: International interdisciplinary scientific conference “Biologically active substances and materials” (Novy Svet, 27 May – 1 June 2013) Novy Svet, AR Crimea, 2013. P. 406.
60. **Soldatkin O.O.**, Kucherenko I.S., Didukh D.Yu., Schuvailo O.M., Cespuglio R., Marinesco S., Soldatkin A.P. Development of microbiosensors for determination of neurotransmitters: International interdisciplinary scientific conference “Biologically active substances and materials” (Novy Svet, 27 May – 1 June 2013) Novy Svet, AR Crimea, 2013. P. 418.
61. Peshkova V.M., **Soldatkin O.O.**, Jaffrezic-Renault N., Akata B., Dzyadevych S.V. Optimization of enzyme multibiosensor system for simultaneous carbohydrates determination: FEBS Workshop “Biological Surfaces and Interfaces” (Catalonia, 30 June – 05 July 2013) Catalonia, Spain, 2013. P. 49.
62. Peshkova V.M., Dudchenko O.Y., **Soldatkin O.O.**, Kasap B.O., Akata B., Dzyadevych S.V. Testing method of conductometric transducers for development of enzyme biosensors: International Conference “Functional Materials” (Partenit, 3-8 October 2013) Partenit, Crimea, Ukraine, 2013. P. 444.
63. Kucherenko I., **Soldatkin O.**, Jaffrezic-Renault N., Lagarde F., Dzyadevych S., Soldatkin A. Amperometric biosensor for evaluation of creatine kinase activity in blood serum samples: 6-th International scientific and technical conference “Sensor electronics

- and microsystems technologies” (Odessa, 29 September – 3 October 2014) Odessa, 2014. P. 181.
64. Kucherenko I., **Soldatkin O.**, Jaffrezic-Renault N, Lagarde F., Dzyadevych S., Soldatkin A. Determination of creatine kinase in blood serum by using an ATP-sensitive biosensor: E-MRS 2015 Spring Meeting, Symposium, “Materials and biosensor systems for *in vitro* diagnostic applications” (Lille, 11-15 May 2015). Lille, France, 2015. P. 29.
65. Kucherenko I., **Soldatkin O.**, Jaffrezic-Renault N., Dzyadevych S., Soldatkin A.P., Lagarde F. Amperometric enzyme biosensor for determination of creatine kinase activity: Journee de printemps de la SCF en Rhone Alpes (Lyon, 11 Juin, 2015). Lyon, France, 2015. P. 31.
66. Pyeshkova V.N., Dudchenko O.Y., **Soldatkin O.O.**, Kasap B.O., Akata B., Dzyadevych S.V. Development of conductometric biosensor for lactose determination with improved characteristics: International research and practice conference: Nanotechnology and nanomaterials (Lviv, 26-29 August, 2015). Lviv, 2015. P. 427.
67. Siediuko D.V., Kucherenko D.Y, Kucherenko I.S, **Soldatkin O.O.**, Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P. Development of amperometric biosensor for choline determination: тези 5-ої Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 12-13 травня 2016 р.). Київ, 2016. С.124.
68. Pyeshkova V., Dudchenko O., **Soldatkin O.**, Dzyadevych S. Improvement of amperometric transducer selectivity using nanosized phenylenediamine films: International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (Lviv, 24-27 August 2016) Lviv, Ukraine, 2016. P.352.
69. Прилипко В.А., Куйбида М.А., **Солдаткин А.А.**, Дзядевич С.В. Кондуктометрический биосенсор на основе уреазы и аргиназы для количественного определения аргинина в биологических жидкостях: тези 4-ї Міжнародної наукової конференції молодих вчених і студентів «Перспективи розвитку біології, медицини і фармації» (Шимкент, 9-10 грудня 2016 р.) Шимкент, Казахстан. С. 25.
70. Kucherenko I.S., **Soldatkin O.O.**, Marchenko S.V., Soldatkina O.V., Prilipko V.O., Kuibida M.A., Cherenok S.O., Prynova O.S., Sylenko O.M., Kalchenko O.I., Kalchenko V.I., Dzyadevych S.V. Comparison of the possibility of using a calixarene based sensor and a two enzymes based biosensor for arginine analysis: International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials» (Kyiv, 27-30 August 2018) Kyiv, 2018. P.66.

АНОТАЦІЯ

Солдаткін О.О. **Основи створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, 2019.

Дисертація присвячена розробці фундаментальних та технологічних основ створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів для практичного застосування в різних галузях людської життєдіяльності.

Розроблено нові методики тестування електрохімічних перетворювачів та нові алгоритми вибору оптимальних вимірювальних приладів та схем аналізу для покращення ефективності функціонування мультиферментних біосенсорів.

Розроблено низку амперометричних та кондуктометричних біосенсорів з використанням різних мультиферментних біоселективних елементів (каскади ферментативних реакцій, конкуренція за субстрат, інгібіторний аналіз, визначення реактиваторів тощо) та створено їхні діючі лабораторні прототипи. Запропоновано узагальнюючі технологічні схеми виготовлення біосенсорних пристроїв на основі мультиферментних біоселективних елементів.

Створені мультиферментні біосенсори апробовано при аналізі реальних біологічних, фармацевтичних, харчових та екологічних зразків. Показано високий рівень кореляції результатів, отриманих біосенсорними та традиційними методами аналізу.

Ключові слова: біосенсори, кондуктометрія, амперометрія, ферменти, мультиферментні системи, електрохімічні перетворювачі.

SUMMARY

Soldatkin O.O. **Fundamentals of multi-enzyme electrochemical biosensors creation.** –Manuscript.

Thesis for the degree of Doctor of Biological Sciences on a speciality 03.00.20 – biotechnology. – Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation is devoted to the development of fundamental and technological bases for the creation of multi-enzyme electrochemical biosensors for practical application in various fields of human activity.

An important stage in the creation of any multi-enzyme biosensor is the testing and preparation of electrochemical transducers. Thus, the corresponding methods are developed for amperometric and conductometric transducers. The main characteristic of electrochemical transducers is their sensitivity to the changes in conductivity (conductometry) or in concentration of hydrogen peroxide (amperometry). If the transducer sensitivity is insufficient, the techniques of transducer surface modification are used. Next, the parameters of transducer operation (current frequency, input signal amplitude, working potential, etc.) are to be optimized. Then the sensor selectivity towards the interferences possibly present in the real samples is assessed. When there is lack of selectivity, additional polymer membranes are applied using the methods proposed in the work. Next, the working stability of the electrochemical transducers is investigated; finally, the transducers are tested as a part of the enzyme biosensors.

The procedures are proposed to compare the measuring instruments and circuits of analysis. These procedures are mainly the same for amperometry and conductometry, but they can differ in specific experiments. First, the comparison was made regarding the signals and calibration curves of electrochemical transducers, obtained with different analytical instruments and/or circuits. Next, the transducers stability and selectivity were compared at various circuits of their connection. Finally, the basic parameters of various devices and/or circuits of analysis were analyzed, in particular, portability, compactness, ease of use, capability of multi-analysis, cost, etc.

The first variant of multienzyme biosensors is based on the cascades of enzymatic reactions resulting in gradual transformation of the substrate into an electroactive product, which is registered by electrochemical transducers. In the work, the biosensors developed for the determination of lactose, maltose, arginine and acetylcholine were based on various cascades of enzymatic reactions. At the first stage, the initial biosensor responses and the calibration curves are obtained for the initial variant of device. The next important step in the multibiosensor development is optimization of basic parameters of immobilization, i.e. concentrations of enzymes and crosslinking agent and duration of the process. Then the influence of the parameters of the analyzed solution on the work of the biosensor was studied. It is also necessary to explore such parameters as signal reproducibility, operational stability, storage stability, repeatability of biosensor preparation, selectivity for possible interferents, etc. The last step in the development of biosensors is to test their analytical characteristics, such as sensitivity towards substrate, linear working range, minimal limit of detection, baseline noise and drift, measurement error, etc.

The next task was to evaluate the chances of biosensors based on the competition of different enzymes in the bioselective element for the target substrate and to analyze their peculiarities. Two bienzyme biosensors for determination of ATP and glutamate have been developed. When developing the first biosensor, its sensitivity to ATP was studied in the presence of glucose of different concentrations. It was found that the ranges of biosensor determination of ATP differed depending on the glucose concentration in the analyzed solution. Therefore, when working with real samples, it is necessary to control the glucose concentration in the sample. The effect of magnesium ions (cofactor HK) and temperature on the operation of the biosensor for ATP determination was also investigated.

When creating the bienzyme biosensor for the glutamate determination considerable efforts have been made to improve its selectivity with respect to electroactive substances. It was found when ascorbate oxidase was added to the bioselective element of a biosensor based on glutamate oxidase, the response to glutamate remained constant whereas the response to ascorbic acid significantly reduced.

Two multienzyme biosensors have been developed for indirect determination of the substances. The biosensor for analysis of the creatine kinase (CK) activity was created. The second biosensor was based on the effect of inhibition of the cascade of enzymatic reactions by heavy metal ions, and following reactivation. When creating a biosensor for determination of the CK activity, in addition to the traditional stages of development, it was studied the effect of concentrations of creatine phosphate and ADP (CK substrates). In the multienzyme biosensor for determination of EDTA and cysteine, the concentration of sucrose as a substrate for inhibitory analysis was determined to be 1.25 mM. Next, it was determined the optimal concentrations of heavy metals, at which 40 - 60% inhibition was obtained. Further, the inhibited biosensors were reactivated with the reactivators in different concentrations and the calibration curves for EDTA and cysteine determination were plotted.

Using the created laboratory prototypes of multi-enzyme biosensors, a number of real biological, pharmaceutical, food and environmental samples were analyzed. The biosensor data are verified by traditional methods of analysis and the high level of correlation of the obtained results is shown.

Thus, the scientific and technological bases for creating multienzyme electrochemical biosensors are substantiated and elaborated for practical use in medical diagnostics, environmental protection, agriculture, monitoring biotechnological processes, control the quality of food.

Keywords: biosensors, conductometry, amperometry, enzymes, multienzyme systems, electrochemical transducers.

АННОТАЦИЯ

Солдаткин А.А. **Основы создания мультиферментных электрохимических биосенсоров.** – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2019.

Диссертация направлена на разработку фундаментальных и технологических основ создания мультиферментных электрохимических биосенсоров для практического применения в различных областях человеческой жизнедеятельности.

Разработаны новые методики тестирования электрохимических преобразователей и новые алгоритмы выбора оптимальных измерительных приборов и схем анализа для повышения эффективности функционирования мультиферментных биосенсоров.

Разработан ряд амперометрических и кондуктометрических биосенсоров с использованием различных мультиферментных биоселективных элементов (каскады ферментативных реакций, конкуренция за субстрат, ингибиторный анализ, определение реактиваторов т.д.) и созданы их действующие лабораторные прототипы. Предложено обобщающие технологические схемы изготовления биосенсорных устройств на основе мультиферментных биоселективных элементов.

Созданные мультиферментные биосенсоры апробированы при анализе реальных биологических, фармацевтических, пищевых и экологических образцов. Показан высокий уровень корреляции результатов полученных биосенсорными и традиционными методами анализа.

Ключевые слова: биосенсоры, кондуктометрия, амперометрия, ферменты, мультиферментные системы, электрохимические преобразователи.