

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Національна академія наук України
Інститут молекулярної біології і генетики

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

СОЛДАТКІН ОЛЕКСАНДР ОЛЕКСІЙОВИЧ

УДК 543.555+577.15+543.553

ДИСЕРТАЦІЯ

**ОСНОВИ СТВОРЕННЯ МУЛЬТИФЕРМЕНТНИХ ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ
БІОСЕНСОРІВ**

03.00.20 – біотехнологія

09 – біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ О.О. Солдаткін

Науковий консультант Дзядевич Сергій Вікторович, доктор біологічних наук,
професор

Київ – 2019

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, – Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2019.

Найпоширенішою групою біосенсорів є електрохімічні ферментні біосенсори, розповсюдженість яких пояснюється їхніми перевагами у порівнянні з традиційними методами аналізу. Відповідно, в останні роки електрохімічні ферментні біосенсори інтенсивно досліджуються.

На жаль не всі ферменти в своїх реакціях використовують чи продукують речовини, що можна детектувати електрохімічними перетворювачами. Саме тому обмежується і коло речовин, що можна детектувати моноферментними електрохімічними біосенсорами. З метою вирішення даної проблеми розробляються біосенсори на основі декількох ферментів. Мультиферментні системи також можуть бути застосовані для покращення аналітичних характеристик біосенсорів для уникнення ефекту інгібування ферменту продуктами ферментативних реакцій, тощо. Відповідно, метою даної роботи є розробка фундаментальних та технологічних основ створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів.

Важливим етапом, що передує розробці будь-якого мультиферментного біосенсора, є тестування та підготовка електрохімічних перетворювачів для конструювання біосенсорів. Відповідно в роботі розроблено методики тестування амперометричних та кондуктометричних перетворювачів.

При тестуванні електрохімічних перетворювачів основним показником є їхня чутливість до зміни провідності (кондуктометрія) або до концентрації пероксиду водню (амперометрія). Якщо чутливість перетворювача недостатня, застосовуються методики модифікації поверхні. Далі обираються оптимальні параметри роботи перетворювача (частота струму, амплітуда вхідного сигналу, робочий потенціал, тощо). Після цього перевіряється селективність сенсора відносно інтерферентів, що часто можуть бути присутніми в реальних зразках. Якщо селективність є недостатньою, застосовуються запропоновані в роботі методики нанесення додаткових полімерних мембран. Далі досліджується стабільність роботи електрохімічних перетворювачів, і, на кінець, проводиться апробація перетворювачів у складі ферментних біосенсорів. Якщо на одній із стадій перевірки амперометричний чи кондуктометричний перетворювач не відповідав необхідним параметрам, його відбраковували.

В роботі запропоновано процедури порівняння вимірювальних приладів та схем аналізу. Основні етапи цих процедур однакові для амперометрії та кондуктометрії, але конкретні експерименти в рамках кожного з етапів відрізнялись для різних методів вимірювання. Спочатку проводили порівняння сигналів та калібрувальних кривих електрохімічних перетворювачів, отриманих з використанням різних приладів та/або схем аналізу. Далі порівнювали стабільність та селективність перетворювачів за різних схем їх підключення, і, на кінець, проводили аналіз та порівняння базових параметрів роботи різних приладів та/або схем аналізу, таких як портативність, компактність, простота використання, можливість мультианалізу, собівартість, тощо.

Першим варіантом мультиферментних біосенсорів є біосенсори на основі каскадів ферментативних реакцій, в результаті яких, субстрат поступово перетворюється до електроактивного продукту що реєструється

електрохімічними перетворювачами. В роботі розроблено біосенсиори на основі різних каскадів ферментативних реакцій для визначення лактози, мальтози, аргініну та ацетилхоліну. В ході протікання кожного з цих каскадів, цільова речовина розщеплюється до електроактивних речовин, які детектуються за допомогою електрохімічних перетворювачів. Величини сигналів на ці електроактивні речовини є мірою концентрації цільової речовини в розчині.

При розробці будь-якого біосенсора притримуються основних етапів. Першим етапом є отримання первинних відгуків біосенсорів та калібрувальних кривих, що дає змогу оцінити перспективність розробки та вибудувати послідовність конкретних дій для створення біосенсора з необхідними аналітичними характеристиками. Наступним важливим етапом створення мультиферментних біосенсорів є оптимізація основних параметрів іммобілізації. Підбирають оптимальну концентрацію ферментів і зшиваючого агенту та вибирають тривалість іммобілізації. Третім етапом є вивчення впливу параметрів аналізованого розчину на роботу біосенсора. При розробці біосенсорів для визначення ацетилхоліну, лактози, мальтози та аргініну перевіряли вплив рН, концентрацій робочого буфера, іонної сили, температури та інших параметрів на роботу всіх біосенсорів. Отримані результати обов'язково враховували при роботі з реальними зразками.

При розробці кожного мультиферментного біосенсора також досліджують такі параметри, як відтворюваність сигналів, операційна стабільність, стабільність при зберіганні, відтворюваність приготування біосенсорів, селективність відносно можливих інтерферентів, тощо. Останнім етапом розробки біосенсорів є перевірка аналітичних характеристик, таких як чутливість до субстрату, лінійний діапазон роботи, мінімальна межа вимірювання, шум та дрейф базової лінії, похибка вимірювання, тощо.

В роботі продемонстровано перспективність розробки мультиферментних біосенсорів на основі каскадів ферментативних реакцій та визначено переваги та недоліки даного типу біосенсорів.

Наступним завданням було оцінити можливість розробки біосенсорів на основі конкуренції різних ферментів в біоселективному елементі за субстрат та проаналізувати особливості функціонування таких біосенсорів. Розроблено два біферментних біосенсора. Перший біосенсор було розроблено для визначення АТФ на основі глюкозооксидази (ГОД) та гексокінази (ГК). Якщо в аналізованому розчині з'являється глюкоза, починає працювати ГОД і реєструється відгук біосенсора на глюкозу. Далі при додаванні в розчин АТФ починає працювати ГК, яка конкурує з ГОД за глюкозу, відповідно відгук на глюкозу зменшується. Мірою зменшення цього відгуку є концентрація АТФ. Другий біосенсор був розроблений для визначення глутамату на основі двох ферментів: глутаматоксидази (ГЛОД) та аскорбатоксидази (АОД). ГЛОД розщеплювала глутамат до електроактивних речовин, а АОД розщеплювала аскорбінову кислоту (найвпливовіший інтерферент) для зменшення її впливу на характеристики біосенсора.

При розробці першого біосенсора досліджували його чутливість до АТФ в присутності різних концентрацій глюкози. Встановлено, що діапазони біосенсорного визначення АТФ відрізнялись в залежності від концентрації глюкози в розчині. Змінювалась як чутливість до АТФ, так і лінійна частина діапазону роботи біосенсора. Тому при роботі біосенсора з реальними зразками необхідно контролювати концентрацію глюкози в пробі. Також досліджували вплив іонів магнію (кофактору ГК) та температури на роботу біосенсора для визначення АТФ. Використовувалась оптимальна концентрація іонів магнію в робочому розчині – 2 мМ.

При розробці біферментного біосенсора для визначення глутамату значні зусилля були направлені на покращення його селективності відносно

електроактивних речовин. Встановлено, що коли у біоселективний елемент біосенсора на основі лише глутаматоксидази додавали аскорбатоксидазу, відгук біосенсора на глутамат залишався сталим, але значно зменшувався відгук на аскорбінову кислоту.

Таким чином, продемонстровано доцільність розробки біосенсорів на основі конкуренції кількох ферментів за субстрат та проаналізовано особливості функціонування мультиферментних біосенсорів такого типу.

Також розроблено два мультиферментних біосенсори для непрямого визначення субстратів. Перший біосенсор для визначення активності креатинкінази (КК) був створений з використанням біосенсора для визначення АДФ. Коли у вимірювальну комірку додавали АДФ, креатин фосфат та креатинкіназу, починала продукуватись АТФ. Відповідно, ГК активно конкурувала за субстрат з ГОД, фосфорилуючи глюкозу, що призводило до зменшення відгуків на глюкозу. Швидкість зменшення цих відгуків була мірою активності КК в розчині.

В основі роботи наступного біосенсора лежав ефект інгібування каскаду ферментативних реакцій іонами важких металів, а далі його реактивація різними концентраціями ЕДТА або цистеїну. Відповідно, рівень відновлення відгуку на субстрат був мірою концентрації реактиватора.

Під час створення біосенсора для визначення активності КК, окрім традиційних етапів розробки, вивчали вплив концентрацій креатинфосфату та АДФ (субстрати КК) на біосенсорне визначення активності КК, обирались концентрації АДФ та креатинфосфата для оптимальної роботи біосенсора.

При розробці мультиферментного біосенсора для визначення концентрацій ЕДТА та цистеїну використовували ефекти реактивації попередньо заінгібованих ферментів. Першим етапом роботи було визначено необхідну концентрацію сахарози - 1,25 мМ, як субстрату при інгібіторному аналізі. Далі з використанням цієї концентрації сахарози визначали

оптимальні концентрації важких металів, за яких можна було отримати рівень інгібування від 40 до 60%. Далі біосенсиори, заінгібовані на 40-60%, реагували різними концентраціями реактиваторів і отримували калібрувальні криві біосенсорного визначення ЕДТА та цистеїну.

Таким чином, розроблено біосенсиори на основі мультифункціонального використання ферментів для непрямого аналізу речовин та оцінено перспективність таких варіантів біосенсорів.

Обов'язковим етапом дисертаційної роботи була демонстрація можливості роботи мультиферментних біосенсорів з реальними зразками та проведення верифікації отриманих результатів.

З використанням триферментного біосенсора було проведено аналіз зразків молока на наявність в них лактози. В якості контрольного методу використовували метод на основі вискоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Коефіцієнт кореляції становив 0,930.

Двоферментний кондуктометричний біосенсор, за оптимальної його конструкції та з урахуванням оптимальних умов функціонування, було протестовано шляхом аналізу концентрації аргініну у фармацевтичних зразках. Оцінено кореляцію концентрацій аргініну в лікарських препаратах, виміряних за допомогою біосенсора та заявлених виробником. Коефіцієнт кореляції склав 0,989.

За допомогою триферментного біосенсора для визначення сахарози було проаналізовано 10 зразків фруктових та овочевих соків і нектарів та 2 зразки меду. Методом контролю було обрано ВЕРХ з подальшою рефрактометричною детекцією. Результати визначення концентрацій глюкози та сахарози в напоях, отримані біосенсорним та контрольним методом були близькими між собою та мали високу кореляцію даних ($R = 0,990$).

З метою перевірки триферментного біосенсора для визначення токсичності, було відібрано проби води з низки водоймищ м. Києва та взято

водні зразки з полігону побутових відходів, з якими було проведено біосенсорні аналізи. Усі перевищення ГДК іонів важких металів в досліджуваних зразках були підтверджені з використанням атомно-адсорбційної спектроскопії.

Для моніторингу секреції глутамату астроцитами під час їхньої механічної стимуляції було застосовано мікробіосенсор, чутливий до L-глутамату. Для контролю селективності отриманого сигналу було застосовано контрольний сенсор. Механічна стимуляція астроцитів призводила до секреції глутамату клітинами, що зафіксувалося за допомогою біферментного біосенсора.

Апробацію біосенсорної системи для визначення глюкози, АТФ та активності КК було проведено в зразках сироватки крові. Як контрольний метод використовувалась спектрофотометрія. Точність визначення концентрації глюкози біосенсорною системою була найвищою, оскільки при цьому використовується прямий ферментний аналіз на основі одного ферменту. Визначення АТФ було менш точним, оскільки ця процедура є більш складною і включає в себе дві конкурентні ферментативні реакції. Методика визначення активності КК схожа на методику визначення АТФ, але через ще одну ферментативну реакцію, має меншу точність вимірювання. Коефіцієнти кореляції при визначенні глюкози, АТФ та активності КК становили 0,975, 0,912 та 0,886, відповідно.

Таким чином, 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.

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

Список наукових праць за темою дисертації:

Статті:

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., **Солдаткін 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 коіммобілізації 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., Сеспуглію 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., Saiapina 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. Р. 66-74. *(Особистий внесок здобувача: дослідження основних аналітичних характеристик біферментного 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 амперметричних 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. Р. 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. T.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).

Патенти на корисну модель та винахід:

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., Кірмесілер 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*).

Тези:

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. Шувайло 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 основі трьох ферментів для інгібіторного аналізу важких металів: 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., Сеспуглію 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 materiaux 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 биологии, медицины и фармации» (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.

SUMMARY

Soldatkin O.O. Fundamentals of multi-enzyme electrochemical biosensors development. –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,– Taras Shevchenko national university of Kyiv, Kyiv, 2019.

The most common group of biosensors is electrochemical enzyme biosensors, the prevalence of which is explained by their advantages over traditional methods of analysis. Therefore, they have been extensively studied in recent years.

Unfortunately, not all enzymes in the reactions use or produce the substances that can be detected by electrochemical transducers. It is the reason of limitation in applicability of the monoenzyme electrochemical biosensors. To solve this problem, the biosensors based on several enzymes are being developed. Multienzyme systems can also be used to improve the analytical performance of biosensors, to avoid the effect of enzyme inhibition by the products of enzymatic reaction, etc. Therefore, the purpose of this work is to develop the fundamental and technological bases for the creation of multienzyme electrochemical biosensors. An important stage in the creation of any multienzyme 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 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. If at any stage the transducer did not correspond to the required characteristics, it was rejected.

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. In these reactions, the target substances are split into electroactive substances, which can be detected by electrochemical transducers. The value of the signals is a measure of the concentration of the target substance in solution.

The main stages in the development of any biosensor are as follows. At the first stage, the initial responses and the calibration curves are obtained for the primary variant of device. It makes possible to assess the potential of the tested

device and to elaborate the further approaches necessary to ensure required analytical characteristics.

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. At the third stage, an influence of the parameters of the analyzed solution on the biosensor operation is investigated. When developing biosensors for the determination of acetylcholine, lactose, maltose and arginine, the effects of pH, working buffer concentration, ionic strength, temperature were studied. The results obtained were taken into account when working with real samples.

When creating multienzyme biosensors it is also necessary to explore such parameters as signal reproducibility, operational stability, storage stability, repeatability of biosensor preparation, selectivity for possible interferences, etc. The last step in the development of biosensors is to test their analytical characteristics, such as sensitivity towards substrate, linear working range, minimum limit of measurement, baseline noise and drift, measurement error, etc.

In the work, the prospect of development of multienzyme biosensors based on cascades of enzymatic reactions is demonstrated; the advantages and disadvantages of this type of biosensors are identified.

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 have been developed. The first - for the ATP determination – included glucose oxidase (GOD) and hexokinase (HK) and was based on their competition for glucose.

In the presence of glucose due to the GOD activity the biosensor response to glucose is registered. When adding ATP to the solution, HK is activated competing with GOD for glucose, which results in a decrease of the biosensor response to glucose. This decrease corresponds to the ATP concentration. The second

biosensor designed for the glutamate determination was based on two enzymes – glutamate oxidase (GLOD) and ascorbate oxidase (AOD). GLOD cleaved glutamate to electroactive substances, whereas AOD cleaved ascorbic acid, the most powerful interferent, to reduce its effect on the biosensor characteristics.

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 solution. The changes in both the sensitivity to ATP and the linear part of the biosensor working range were revealed.

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. The optimal concentration of magnesium ions in the working solution was 2 mM.

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 that when ascorbate oxidase was added to the bioselective element of a biosensor based on glutamate oxidase only, the response to glutamate remained constant whereas the response to ascorbic acid significantly reduced.

Thus, it was demonstrated the feasibility of biosensors based on several enzymes competing for the substrate; their peculiarities were analyzed.

Two multienzyme biosensors have been developed for indirect determination of the substrate. The biosensor for analysis of the creatine kinase (CK) activity was created using the biosensor for ATP determination. ATP was produced when ADP, creatine phosphate and creatine kinase were added to the measuring cell. Accordingly, HK actively competed for the substrate with GOD, phosphorylating

glucose, which resulted in a decrease of responses to glucose. The rate of decrease was a measure of the CK activity in the solution.

The second biosensor was based on the effect of inhibition of the cascade of enzymatic reactions by heavy metal ions, and following reactivation with EDTA or cysteine in different concentrations. Accordingly, the level of restoration of the response to the substrate was a measure of the reactivator concentration.

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), and the concentrations of ADP and creatine phosphate were selected for optimal operation of the biosensor.

In the multienzyme biosensor for determination of EDTA and cysteine, the effects of reactivation of previously inhibited enzymes were utilized. At the first stage, 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.

Thus, the biosensors based on the multifunctional use of enzymes were developed and evaluated for the indirect analysis of substances.

An essential stage of the dissertation was the demonstration of the ability of multienzyme biosensors to analyze real samples and the verification of the results obtained.

Using a three-enzyme biosensor, milk samples were analyzed for the presence of lactose. As a control, the method based on high performance liquid chromatography (HPLC) was used. The correlation coefficient was 0.930.

A two-enzyme conductometric biosensor of optimum design was tested under optimal working conditions for the analysis of arginine concentration in pharmaceutical samples. The correlation of arginine concentrations in the drugs

measured by the biosensor and claimed by the manufacturers was evaluated. The correlation coefficient was 0.989.

Using a three-enzyme biosensor for the determination of sucrose, we analyzed 10 samples of fruit and vegetable juices and nectars and 2 samples of honey. HPLC with following refractometric detection was taken as control. The results of determination of glucose and sucrose concentrations in beverages obtained by both methods were quite close; the correlation coefficient $R = 0.990$.

To test the three-enzyme biosensor for the toxicity determination, the water samples taken from several water reservoirs and a household waste landfill in Kyiv were analyzed. An excess of maximum permissible concentration of heavy metal ions in the samples was confirmed using atomic adsorption spectroscopy.

A microbiosensor sensitive to L-glutamate was used to monitor the secretion of glutamate by astrocytes during their mechanical stimulation. To control the selectivity of the received signal, a control sensor was applied. Mechanical stimulation of astrocytes led to the secretion of glutamate by cells, which was fixed by the bienzyme biosensor.

Testing of the biosensor system for the determination of glucose, ATP and CK activity was performed in blood samples obtained from patients. Spectrophotometry was used as a control method. The accuracy of determination of glucose concentration by the biosensor system was the highest because of using direct analysis based on one enzyme.

The accuracy of ATP determination was somewhat lower since the procedure is more complex and involves two competing enzymatic reactions. The methodology for determination of the CK activity is similar to that for ATP, but includes one more enzymatic reaction, which results in a decrease of the measurement accuracy. The correlation coefficients for determination of glucose, ATP and CK activity were 0.975, 0.912 and 0.886, respectively. Thus, the scientific and technological foundations 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.

Список наукових праць за темою дисертації:

Статті:

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., **Солдаткін 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 коімобілізації 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., Saiapina 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. Р. 66-74. *(Особистий внесок здобувача: дослідження основних аналітичних характеристик біферментного 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 аналізу 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 аналізу 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., Седюко 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)*.

Патенти на корисну модель та винахід:

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., Кірмесілер 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).

Тези:

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 2008 р) Одеса, 2008. С. 231.

47. **Солдаткін О.О.**, Пешкова В.М., Архипова 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 2008 р.) 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 основі трьох ферментів для інгібіторного аналізу важких металів: 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., Сеспуглію 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., Сеспуглію 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 materiaux 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 биологии, медицины и фармации» (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.

ЗМІСТ

Оглавление

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	52
ВСТУП.....	54
РОЗДІЛ 1.....	62
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	62
1.1. Вступ	62
1.2. Біосенсори на основі каскаду ферментативних реакцій	64
1.2.1. Ферментні каскади для визначення вуглеводів	67
1.2.2. Ферментні каскади для визначення ліпідів.....	70
1.2.3. Ферментні каскади для визначення пептидів і протеїнів.....	72
1.2.4. Біосенсори для визначення активності ферментів	73
1.2.5. Використання пероксидази хрому у каскадах реакцій, в яких утворюється пероксид водню	76
1.2.6. Використання діафрази та НАДН-оксидази у каскадах реакцій, в яких утворюється НАД(Ф)Н	79
1.2.7. Інші біосенсори на основі каскадів ферментативних реакцій	81
1.3. Біосенсори на основі циклічних ферментативних реакцій і повторного використання субстрату.....	85
1.4. Біосенсори на основі конкуренції ферментів за субстрат.....	93
1.5. Біосенсори на основі незалежних ферментативних реакцій.....	97
1.6. Висновки до розділу 1	99
РОЗДІЛ 2.....	100
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	100
2.1. Матеріали.....	100
2.2. Конструкції сенсорних перетворювачів.....	103
2.2.1. Кондуктометричні перетворювачі.....	103

2.2.2. Амперометричні перетворювачі на основі дискових платинових електродів	104
2.2.3. Мікроелектрод циліндричного типу на основі вуглецевого волокна...	106
2.2.4. Циліндричний мікроелектрод на основі платинового дроту	107
2.3. Модифікація перетворювачів	108
2.3.1. Методика металізації амперометричних мікроелектродів на основі вуглецевого волокна	108
2.3.2. Методика нанесення додаткової полімерної мембрани на амперометричні перетворювачі.....	108
2.3.3. Методика модифікації поверхні перетворювачів шаром цеоліту.....	109
2.3.4. Методика модифікації біосенсорів додатковою мембраною на основі Нафіон/поліуретан.....	109
2.4. Виготовлення біоселективних елементів	110
2.4.1. Адсорбція ферментів на цеоліті.....	110
2.4.2. Імобілізація ферменту в БСА мембрану в насичених парах глутарового альдегіду	110
2.4.3. Імобілізація ферменту в БСА мембрану в краплі глутарового альдегіду	111
2.4.4. Імобілізація ферменту на нітроцелюлозі	111
2.4.5. Фотополімеризація ферменту в PVA/SbQ	112
2.5. Синтез та дослідження властивостей силікалітів	112
2.5.1. Синтез силікаліту з розміром кристалів 450 нм	112
2.5.2. Синтез силікаліту з розміром кристалів 160 нм	113
2.5.3. Синтез силікаліту з розміром кристалів 80 нм	114
2.5.4. Характеризація частинок силікалітів	114
2.6. Вимірювальні прилади та експериментальні схеми.....	116
2.6.1. Схема експериментальної стаціонарної установки для кондуктометричних вимірювань	116

2.6.2. Схеми експериментальної установки на основі портативного аналізатора «МСР-3».....	117
2.6.3. Метод імпедансної спектроскопії.....	118
2.6.4. Вимірювальна установка для амперометричних досліджень	119
2.7. Методики вимірювання	121
2.7.1. Прямий аналіз субстратів.....	121
2.7.2. Методика проведення інгібіторного аналізу та процесу реактивації...	122
2.7.3. Методика біосенсорного вимірювання реальних зразків.....	122
2.7.4. Методика вимірювання глутамату в культурі астроцитів	124
2.7.5. Метод вимірювання сахарози з використанням високоефективної рідинної хроматографії	125
2.7.6. Спектрофотометричне визначення глюкози, АТФ та КК	125
РОЗДІЛ 3.....	127
ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ ТА ВИМІРЮВАЛЬНИХ СХЕМ.....	127
3.1. Вступ	127
3.2. Оптимізація амперометричних перетворювачів.....	128
3.2.1. Вступ	128
3.2.2. Дослідження чутливості амперометричних перетворювачів за допомогою вольтамперометричних вимірювань	129
3.2.3. Дослідження відтворюваності сигналу амперометричних перетворювачів.....	131
3.2.4. Дослідження селективності амперометричних перетворювачів	133
3.2.5. Використання додаткових мембран для покращення селективності амперометричного перетворювача на основі дискового платиного електроду	139
3.2.6. Дослідження параметрів амперометричного біосенсора на основі модифікованих перетворювачів	142

3.2.7. Підсумки	143
3.3. Дослідження та оптимізація вуглецевого амперометричного мікроперетворювача для створення <i>in vivo</i> біосенсорів.....	144
3.3.1. Вступ	144
3.3.2. Дослідження чутливості мікроперетворювача	146
3.3.3. Дослідження селективності вуглецевих мікроелектродів.....	150
3.3.4. Дослідження стабільності мікроелектродів, покритих полі-мета-фенілендіаміном	153
3.3.5. Перевірка працездатності мікробіосенсора на основі модифікованого перетворювача	154
3.3.6. Підсумки	157
3.4. Методика тестування кондуктометричних перетворювачів для подальшого біосенсорного використання	157
3.4.1. Вступ	157
3.4.2. Дослідження чутливості кондуктометричних перетворювачів	158
3.4.3. Дослідження ідентичності пар електродів кондуктометричних перетворювачів.....	161
3.4.4. Оцінка співвідношення шум/сигнал кондуктометричних перетворювачів.....	162
3.4.5. Порівняння функціональності кондуктометричного перетворювача в диференційному та моно режимах роботи	163
3.4.6. Підсумки	165
3.5. Порівняльний аналіз функціонування двох портативних потенціостатів при роботі з амперометричними біосенсорами	165
3.5.2. Дослідження чутливості перетворювачів до пероксиду водню за допомогою циклічних вольтамперограм	166
3.5.3. Дослідження діапазону визначення пероксиду водню на різних потенціостатах.....	168

3.5.4. Дослідження відтворюваності відгуків амперометричних сенсорів на різних потенціостатах	170
3.5.5. Порівняння роботи двох потенціостатів при роботі з глюкозними біосенсорами.....	171
3.5.6. Підсумки	173
3.6. Порівняльний аналіз функціонування різних установок для кондуктометричних вимірювань при роботі з біосенсорами	175
3.6.1. Вступ	175
3.6.2. Калібрувальні криві кондуктометричних біосенсорів, отримані з використанням різних вимірювальних установок.....	176
3.6.3. Дослідження відтворюваності та селективності сигналів біосенсорів, отриманих на різних установках для кондуктометричних вимірювань	177
3.6.4. Підсумки	178
3.7. Висновки до розділу 3	179
РОЗДІЛ 4.....	180
РОЗРОБКА МУЛЬТИФЕРМЕНТНИХ БІОСЕНСОРІВ.....	181
4.1. Біосенсори на основі каскадів ферментативних реакцій для прямого визначення субстратів.....	181
4.1.1. Біосенсор на основі трьох ферментів для визначення лактози.....	181
4.1.1.1. Вступ	181
4.1.1.2. Принцип роботи лактозного біосенсора	182
4.1.1.3. Вплив параметрів розчину на роботу лактозного біосенсора.....	185
4.1.1.4. Дослідження операційної стабільності та відтворюваності сигналу лактозного біосенсора.....	190
4.1.1.5. Дослідження стабільності сигналу лактозного біосенсора при зберіганні	191
4.1.1.6. Аналіз селективності роботи лактозного біосенсора	192
4.1.1.7. Підсумки	194

4.1.2. Біферментний біосенсор для визначення аргініну	194
4.1.2.1. Вступ	194
4.1.2.2. Принцип роботи аргінінового біосенсора	195
4.1.2.3. Визначення оптимального методу іммобілізації уреазу при розробці біосенсорів для визначення аргініну	196
4.1.2.4. Оптимізація основних параметрів процесу іммобілізації аргінази та уреазу у БСА мембрані в краплі глютарового альдегіду	199
4.1.2.5. Вивчення впливу параметрів аналізованого розчину на роботу біосенсора для визначення аргініну	203
4.1.2.6. Визначення відтворюваності і операційної стабільності сигналів та стабільності при зберіганні аргінінового біосенсора	207
4.1.2.7. Підсумки	209
4.1.3. Триферментний кондуктометричний біосенсор для визначення мальтози	209
4.1.3.1. Вступ	209
4.1.3.2. Принцип роботи біосенсора для визначення мальтози	210
4.1.3.3. Вплив параметрів аналізованого розчину на роботу біосенсора для визначення мальтози	211
4.1.3.4. Дослідження відтворюваності та стабільності при зберіганні сигналів біосенсора для визначення мальтози	215
4.1.3.4. Перевірка селективності мультиферментного біосенсора для визначення мальтози	217
4.1.3.5. Дослідження основних аналітичних характеристик триферментного біосенсора для визначення мальтози	218
4.1.3.6. Підсумки	219
4.1.4. Амперометричний біосенсор на основі двох ферментів для визначення ацетилхоліну	220
4.1.4.1. Вступ	220

4.1.4.2. Принцип роботи амперометричного біосенсора на основі коїмобілізованих ацетилхолінестерази та холінооксидази	222
4.1.4.3. Підбір оптимальних умов формування біоселективного елементу.	223
4.1.4.4. Дослідження впливу параметрів аналізованого розчину на роботу двоферментного біосенсора.....	224
4.1.4.5. Залежність роботи біосенсора від рН	227
4.1.4.6. Операційна стабільність двоферментного біосенсора	228
4.1.4.7. Відтворюваність відгуків біосенсора	229
4.1.4.8. Дослідження селективності біферментного біосенсора	231
4.1.4.9. Аналітичні характеристики біосенсора	232
4.1.4.10. Підсумки	233
4.2. Біосенсори на основі конкуренції ферментів за субстрат	234
4.2.1. Амперометричний біосенсор на основі ГОД/ГК для визначення АТФ235	
4.2.1.1. Вступ	235
4.2.1.2. Принцип роботи АТФ біосенсора	235
4.2.1.3. Дослідження чутливості біосенсора на основі ГОД/ГК до АТФ	237
4.2.1.4. Вплив рН на роботу біосенсора на основі ГОД/ГК	238
4.2.1.5. Вплив іонів Mg^{2+} на величину відгуків біосенсора на основі ГОД/ГК	240
4.2.1.6. Вивчення залежності величини відгуків мікробіосенсора на АТФ від концентрації глюкози в аналізованому розчині	241
4.2.1.7. Дослідження впливу температури на відгуки двоферментного біосенсора	243
4.2.1.8. Дослідження операційної стабільності та відтворюваності відгуків двоферментного біосенсора.....	244
4.2.1.9. Дослідження селективності розробленого біферментного біосенсора для визначення АТФ	246

4.2.1.10. Порівняння аналітичних характеристик мультиферментного біосенсора для визначення АТФ з відомими сенсорними системами	247
4.2.1.11. Підсумки	249
4.2.2. Біферментний мікробіосенсор для визначення глутамату	250
4.2.2.1. Вступ	250
4.2.2.2. Принцип роботи біосенсора для визначення глутамату	251
4.2.2.3. Покращення селективності біосенсора для визначення глутамату ..	252
4.2.2.4. Дослідження чутливості мікробіосенсора до глутамату	253
4.2.2.5. Дослідження стабільності біосенсора на основі ГЛОД/АОД для визначення глутамату	255
4.2.2.6. Підсумки	257
4.3. Непрямий аналіз за допомогою мультиферментних біосенсорів	257
4.3.1. Біосенсор на основі коїмобілізованих ГОД з гексокіназою для аналізу активності креатинкінази	258
4.3.1.1. Вступ	258
4.3.1.2. Принцип роботи біосенсора для визначення активності креатинкінази	259
4.3.1.3. Розробка процедури біосенсорного аналізу активності КК у сироватці крові	261
4.3.1.5. Аналітичні характеристики біосенсора для визначення КК	265
4.3.1.5. Перевірка відтворюваності сигналів біосенсора	267
4.3.1.6. Підсумки	268
4.3.2. Мультиферментний біосенсор для визначення ЕДТА, цистеїну та іонів важких металів	268
4.3.2.1. Вступ	268
4.3.2.2. Принцип роботи біосенсора при визначенні іонів важких металів, ЕДТА та цистеїну	270

4.3.2.3. Оптимізація триферментного біосенсора для визначенні іонів важких металів	271
4.3.2.4. Перевірка можливості використання триферментного біосенсора для визначення ЕДТА та цистеїну	275
4.3.2.5. Аналітичні характеристики біосенсора для визначення ЕДТА та цистеїну.....	276
4.3.2.6. Підсумки	277
4.4. Висновки до розділу 4.....	278
РОЗДІЛ 5.....	279
ЗАСТОСУВАННЯ МУЛЬТИФЕРМЕНТНИХ БІОСЕНСОРІВ ДЛЯ РОБОТИ З РЕАЛЬНИМИ ЗРАЗКАМИ ТА ВЕРИФІКАЦІЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ	283
5.1. Вступ	283
5.2. Вимірювання концентрації лактози в зразках молока з використанням триферментного біосенсора.....	284
5.2.1. Перевірка основних характеристик мультиферментного біосенсора для використання його для аналізу лактози в молоці.....	284
5.2.2. Вимірювання концентрації лактози в коров'ячому молоці	286
5.3. Вимірювання концентрації аргініну в зразках лікарських препаратів з використанням двоферментного біосенору.....	287
5.3.1. Перевірка аналітичних характеристик двоферментного біосенсора для визначення аргініну в реальних зразках	287
5.3.2. Вимірювання концентрації аргініну в зразках ліків	290
5.4. Аналіз сахарози в реальних зразках напоїв за допомогою біосенсора на основі трьох ферментів	292
5.4.1. Розробка методики біосенсорного визначення сахарози	292
5.4.2. Вимірювання концентрації сахарози в зразках соків та меду.....	293

5.5. Вимірювання концентрацій іонів важких металів в зразках водою з використанням біосенсора на основі трьох ферментів	296
5.5.1. Перевірка селективності триферментного біосенсора для аналізу реальних зразків водою	296
5.5.2. Вимірювання іонів важких металів в зразках водою	296
5.6. Використання амперометричних мікробіосенсорів на основі коїмобілізованих ГЛОД/АОД для визначення глутамату в культурі клітин астроцитів	298
5.7. Аналіз концентрації АТФ, глюкози та активності креатинінкінази у зразках сироватки крові за допомогою мультиферментної біосенсорної системи	300
5.8. Висновки до розділу 5	305
РОЗДІЛ 6.....	308
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	308
6.1. Вступ	308
6.2. Аналіз доцільності розробки біосенсора на основі декількох ферментів.....	308
6.4. Переваги використання мультиферментних систем в складі біосенсорів.....	315
6.5. Обмеження при створенні мультиферментних біосенсорів	317
6.6. Метрологічні дослідження.....	319
6.6.1. Відпрацювання двох методик приготування калібрувальних розчинів аналітів, концентрація яких визначається мультиферментними біосенсорами.....	320
6.6.2. Відпрацювання методик градуювання різних варіантів лабораторних прототипів біосенсорів на основі мультиферментних систем.....	321
6.7. Висновки до розділу 6.....	322
ВИСНОВКИ	Error! Bookmark not defined.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	323
ДОДАТОК А	363
ДОДАТОК Б	374
ДОДАТОК В.....	375
ДОДАТОК Г.....	376
ДОДАТОК Д.....	377
ДОДАТОК Е.....	378

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АДФ – аденозин-5'-дифосфат

АЛТ – аланінамінотрансфераза

АМФ – аденозин-5'-монофосфат

АОД – аскорбатоксидаза

АСТ – аспаратамінотрансфераза

АТФ – аденозин-5'-трифосфат

АцХЕ – ацетилхолінестераза

БЕСВ – багатофункціональна електрохімічна система VoltaLab

БСА – сироватковий альбумін бика

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ГА – глутаровий альдегід

ГД – глутаматдегідрогеназа

ГЕ – гребінчастий електрод

ГК – гексокіназа

ГлОД – глутаматоксидаза

ГОД – глюкозооксидаза

ГТФ – гуанозин-5'-трифосфат

ГФО – гліцерофосфатоксидаза

ДЕ – дисковий електрод

ДМСО – диметилсульфоксид

ЕДТА – етилендіамінтетраоцтова кислота

ЕУПА – експериментальна установка на основі портативного аналізатора «МСР-3»

ІСПТ - іон-селективний польовий транзистор

КД – креатиніндеїміназа

КК – креатинкіназа
КП – кондуктометричний перетворювач
КФ – креатин фосфат
ЛД – лактатдегідрогеназа
ЛОД – лактат оксидаза
МДН – метал-діалектрик-напівпровідник
НАД – нікотинамідаденіндинуклеотид
рН-ПТ – рН-чутливий польовий транзистор
ПАМ-2 – піридин-2-альдоксимметилйодид
ПКВ – портативний прилад для кондуктометричних вимірювань
ПОД – піруватоксидаза
ПТ – польовий транзистор
ПХ – пероксидаза хрому
ПФД – поліфенілендіамін
РУ – рекомбінантна уреазини
СУНУ – установка на основі нановольтметра “Unipan-233”
TEOS – тетраетил ортосилікат
ТРАОН – тетрапропіламмонію гідрохлорид
ТТФ – тетратіафульвален
ТФ – тіамініпірофосфат
УКВ – установка для кондуктометричних вимірювань
УТФ – урацил-5'-трифосфат
ХОД – холіноксидаза

ВСТУП

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, моніторингу якості продуктів харчування, в сільському господарстві та контролі перебігу біотехнологічних процесів на виробництвах.

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 [1, 2]. 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 [3, 4].

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 біосенсориці 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 біосенсориці 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 біосенсорики.

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 нанокмпозитних комплексів», НДР № 2.2.4.22 «Електрохімічні мультибіосенсори 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», білаторального 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 біосенсори 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 біосенсори 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 електрохімічних перетворювачів.

Предмет дослідження: електрохімічні перетворювачі, схеми електрохімічного аналізу, біосенсори 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 біосенсори 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 докільця 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, або ж під його безпосереднім керівництвом та участю у 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 Cespuoglio R., doctor Marinesco S., результати досліджень опубліковано в спільних публікаціях. Обговорення та аналіз результатів досліджень проведено з науковим консультантом д.б.н., проф. С.В. Дзядевичем, академіком НАН України, д.б.н., проф. Єльською Г.В., академіком НАН України, д.б.н., проф. Солдаткіним О.П., яким здобувач висловлює щирю вдячність за надану допомогу та увагу до дисертаційної роботи. Також дисертант щиро вдячний д.ф.-м.н., с.н.с. Куклі О.Л. з Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України за допомогу в розробці вимірювальних систем з використанням мультиферментних біосенсорів та д.т.н., с.н.с. Мельнику В.Г. з Інституту електродінамики 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 із вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, експериментальної частини, яка в свою чергу складається із трьох розділів, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел, що містить 314 найменувань. Робота викладена на 378 сторінках машинописного тексту. Результати дисертації та допоміжні матеріали проілюстровано на 108 рисунках та представлено в 25 таблицях.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Вступ

Електрохімічні біосенсори на основі іммобілізованих ферментів є однією з найпопулярніших груп біосенсорів, а також найбільш комерційно успішною. Вони розробляються для широкого спектру використань – клінічної діагностики, сільського господарства, харчової промисловості, біотехнології, екологічного моніторингу, використання у побуті, тощо [5–8]. Популярність саме електрохімічних біосенсорів можна пояснити їх невисокою вартістю, швидкою та простою процедурою проведення аналізу, та компактним розміром вимірювальної установки (яка є часто портативною) [9]. До того ж, успіх їх використання пов'язаний з розробкою планарних електродів, виготовлених шляхом трафаретного друку; такі електроди стали дуже поширеними завдяки дешевизні, високій чутливості та здатності до мініатюризації [1, 2]. Залежно від типу перетворювача і вимірюваної фізичної величини, електрохімічні біосенсори поділяються на амперометричні, потенціометричні, кондуктометричні та імпедиметричні [10–15].

В якості чутливого елемента електрохімічних біосенсорів дуже часто виступають ферменти. Популярність ферментів пояснюється швидким каталізом реакцій, високою субстратною специфічністю та відносно тривалою стабільністю ферментів (особливо за умов іммобілізації); великий вибір комерційних препаратів очищених ферментів дає змогу конструювати

біосенсори на основі найрізноманітніших біохімічних реакцій. З цих причин, ферменти біосенсори досліджуються дуже інтенсивно [3, 4].

Втім, діапазон ферментів, які можуть бути використані для створення електрохімічних біосенсорів, має суттєве обмеження – далеко не всі ферменти в своїх реакціях використовують чи продукують речовини, що можна детектувати електрохімічними перетворювачами. Значна частина ферментативних реакцій не може бути прямо зареєстрована. Тому обмежується і коло сполук, які можливо визначати за допомогою ферментних електрохімічних біосенсорів. Для того, щоб обійти дане обмеження, створюються біосенсори, які містять декілька ферментів у чутливому біоселективному елементі, причому детектується перетворювачем біосенсора зазвичай продукт реакції лише одного з ферментів. Також поширеним є використання додаткового ферменту в складі біосенсора для гідролітичного розщеплення складних сполук (олігосахаридів, білків, ліпідів) до більш простих, які детектуються за допомогою інших ферментів. Певною мірою такий підхід є імітуванням природної роботи ферментів у клітині, де кілька ферментів одночасно входять до складу мультиферментних комплексів або працюють в одному компартменті. В традиційній клінічній діагностиці каскадні ферментні реакції використовуються вже понад 40 років у так званих спарених ферментних наборах для спектрофотометричного визначення різноманітних речовин, від концентрації амінокислот до активності біомаркерних ферментів [16, 17]. Мультиферментні системи використовуються для створення надчутливих афінних біосенсорів на основі аптамерів або антитіл, в яких ферментні реакції використовуються для детекції зв'язування рецепторної молекули з цільовим субстратом [18, 19]. Крім аналітичних застосувань, штучні мультиферментні комплекси (імобілізовані та вільні) знаходять широке застосування у різних біотехнологічних процесах, де їх мета використання певною мірою подібна

до такої в біосенсорах – каталізувати ефективно перетворення вихідного субстрату в цільовий продукт [20].

Втім, цілі використання мультиферментних систем в біосенсорах не обмежуються лише розширенням спектру речовин, які можна визначати. Мультиферментні системи також використовуються для покращення характеристик біосенсорів (в першу чергу чутливості), як буде показано нижче. Іншою перевагою використання каскаду реакцій є уникнення ефекту інгібування ферменту продуктом ферментної реакції. Багато ферментів (наприклад, ферменти циклу Кребса) інгібуються їхніми продуктами або проміжними сполуками [21–23]. Наявність каскаду ферментативних реакцій, в якому продукт одного ферменту одразу ж використовується іншим ферментом, забезпечує безперервне протікання реакцій.

В даній роботі представлено огляд існуючих біосенсорів на основі іммобілізованих мультиферментних систем і проаналізовано переваги і недоліки такого підходу. Дану роботу структуровано за різними принципами поєднання кількох ферментативних реакцій (послідовні, циклічні, конкурентні або незалежні реакції). Охопити всі використані на даний момент в біосенсорах мультиферментні системи неможливо в рамках одного огляду, тому тут представлено найбільш типові та/або цікаві приклади мультиферментних систем для кожного розділу.

1.2. Біосенсори на основі каскаду ферментативних реакцій

Біосенсори на основі каскаду ферментативних реакцій є найпоширенішою групою мультиферментних біосенсорів. В даному випадку ферменти, які містяться в складі біосенсора, залучені до єдиної послідовності реакцій: перший фермент перетворює одну речовину на іншу, другий фермент перетворює отриману в ході першої реакції речовину на наступну, і

так далі, поки не утвориться електроактивний продукт, який можна буде зареєструвати перетворювачем безпосередньо або через медіатор.

Інколи для підкреслення різних ролей ферментів в складі каскаду, ферменти і реакції на початку ланцюга називають конверсійними, а останній фермент і його реакція, продукт якої детектується, називаються індикаторними [24, 25]. Втім, особливої практичної користі від такої термінології немає і в даній роботі вона не вживається.

Хоча можливе багатоступеневе перетворення речовин за участю багатьох ферментів, в абсолютній більшості випадків використовується два ферменти, оскільки додавання кожного наступного ферменту призводить до ускладнення біосенсора і створює додаткові проблеми. Приклади біосенсорів, які використовують ферментні каскади, наведено в табл. 1.1.

Таблиця 1.1

Приклади біосенсорів, які використовують ферментні каскади

Цільова речовина	Тип перетворювача	Ферментативні реакції	Пропоноване використання	Джерело
Білки	Кондуктометричний золотий ГЕ	Протеїназа К: білок \rightarrow фрагменти білків Проназа: фрагменти білків \rightarrow фрагменти білків + амінокислоти	Біологічні дослідження	[26]
Сахароза	Кондуктометричний золотий ГЕ	Інвертаза: сахароза + $H_2O \rightarrow \beta$ -D-фруктоза + α -D-глюкоза мутаротаза: α -D-глюкоза $\rightarrow \beta$ -D-глюкоза ГОД: β -D-глюкоза + $O_2 \rightarrow$ D-глюконолактон + H_2O_2	Контроль якості продуктів харчування	[27]
Лактоза	Кондуктометричний золотий ГЕ	β -галактозίδαза: лактоза + $H_2O \rightarrow$ галактоза + α -D-глюкоза мутаротаза: α -D-глюкоза $\rightarrow \beta$ -D-глюкоза ГОД: β -D-глюкоза + $O_2 \rightarrow$ D-глюконолактон + H_2O_2	Контроль якості продуктів харчування	[28]

Продовж. табл. 1.1

Мальтоза	Кондуктометричний золотий ГЕ	α -глюкозидаза: мальтоза + H_2O мутаротаза: α -D-глюкоза \rightarrow β -D-глюкоза ГОД: β -D-глюкоза + $\text{O}_2 \rightarrow$ D-глюконолактон + H_2O_2	Контроль якості продуктів харчування	[28]
Малат	Амперометричний золотий ДЕ	Малатдегідрогеназа: малат + $\text{НАД}^+ \rightarrow$ оксалоацетат + НАДН діафороза: $\text{НАДН} + 2\text{ТТФ}^+ \rightarrow \text{НАД}^+ + 2\text{ТТФ}$	Контроль процесів ферментації при виноробництві	[29]
Лактат	Амперометричний золотий ДЕ	ЛОД: лактат + $\text{O}_2 \rightarrow$ піруват + H_2O_2 ПХ: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{ТТФ} \rightarrow 2\text{ТТФ}^+ + \text{H}_2\text{O}$	Контроль процесів ферментації при виноробництві	[29]
Гліцерол	Амперометричний золотий ДЕ	гліцеролдегідрогеназа: гліцерол + $\text{НАД}^+ \rightarrow$ дигідроксиацетон + НАДН діафороза: $\text{НАДН} + 2\text{ТТФ}^+ \rightarrow \text{НАД}^+ + 2\text{ТТФ}$	Контроль якості вина	[30]
Гліцерол	Амперометричний золотий ДЕ	гліцеролкіназа: гліцерол + АТФ \rightarrow гліцерол 3-фосфат + АДФ гліцерол 3-фосфат оксидаза: гліцерол 3-фосфат + $\text{O}_2 \rightarrow$ дигідроксиацетон-фосфат + H_2O_2 ПХ: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{ТТФ} \rightarrow 2 \text{ТТФ}^+ + \text{H}_2\text{O}$	Контроль якості вина	[30]
Холестерол та його естери	Амперометричний скло-вуглецевий електрод	холестеролестераза: естери холестеролу + $\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ холестерол + жирні кислоти холестеролоксидаза: холестерол + $\text{O}_2 \rightarrow$ холестенон + H_2O_2 ПХ: $\text{H}_2\text{O}_2 +$ ферроцен $\rightarrow \text{H}_2\text{O} +$ фероценум	Медична діагностика	[31]
Цитрат	Амперометричний платиновий електрод	цитратліаза: цитрат \rightarrow оксалоацетат + ацетат оксалоацетат декарбоксилаза: оксалоацетат \rightarrow піруват + CO_2 ПОД: піруват + фосфат + $\text{O}_2 \rightarrow$ ацетилфосфат + $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$	Контроль якості харчових продуктів та контроль процесів ферментації	[32]

Білки	Амперометричний платиновий електрод	Трипсин: білок \rightarrow L-амінокислота + пептиди лейцин-амінопептидаза: пептиди \rightarrow L-амінокислота + олігопептид L-оксидаза амінокислот: L-амінокислота + O ₂ + H ₂ O \rightarrow 2-кетокислота + NH ₃ + H ₂ O ₂	Дослідження біологічних біопроектів	[33]
Фосфати	Амперометричний платиновий ДЕ	фосфорилаза мальтози: мальтоза + фосфат \rightarrow α -D-глюкоза + β -D-глюкозофосфат мутаротаза: α -D-глюкоза \rightarrow β -D-глюкоза ГОД: β -D-глюкоза + O ₂ \rightarrow D-глюконолактон + H ₂ O ₂	Екологічний моніторинг	[34]
Креатин	Потенціометричний NH ₄ ⁺ -чутливий електрод	креатиназа: креатин + H ₂ O \rightarrow саркозин + сечовина уреаза: сечовина + H ₂ O \rightarrow 2NH ₃ + CO ₂ .	Медична діагностика	[35]
Аргінін	Потенціометричний NH ₄ ⁺ -чутливий електрод	Аргіназа: L-аргінін + H ₂ O \rightarrow L-орнітин + сечовина Уреаза: сечовина + H ₂ O \rightarrow 2NH ₃ + CO ₂	Медична діагностика	[35]

Примітки: 1 - АДФ – адиозиндифосфат; 2 - АТФ – адиозинтрифосфат; 3 - ГЕ – гребінчастий електрод; 4 - ГОД – глюкозооксидаза; 5 - ДЕ – дисковий електрод; 6 - ЛОД – лактат оксидаза; 7 - НАД – нікотинамідаденіндинуклеотид; 8 - ПОД – піруватоксидаза; 9 – ПХ - пероксидаза хрому; 10 – ТТФ - тетратіафульвален.

1.2.1. Ферментні каскади для визначення вуглеводів

Поширеними є багатоферментні біосенсиори для визначення вуглеводів, оскільки окисно-відновні ферменти (оксидази чи дегідрогенази) використовують як субстрати в основному моносахариди і тому необхідно

спочатку розщепити оліго- або полісахариди до моносахаридів. Найчастіше в таких біосенсорах використовуються глікозил-гідролази, які розщеплюють відповідний складний вуглевод з утворенням глюкози, а глюкоза вже окиснюється ГОД з утворенням глюконолактону та пероксиду водню, який і детектується амперометрично. У випадку кондуктометричних біосенсорів та біосенсорів на основі рН-чутливих польових транзисторів детектується не пероксид водню, а продукт додаткової реакції: глюконолактон спонтанно перетворюється на глюконову кислоту, яка дисоціює на кислотний залишок і іон водню [36, 37]. Останній і спричиняє зміну рН та провідності розчину. Слід відмітити, що ГОД специфічна до β -D-глюкози, в той час як в результаті гідролізу складних вуглеводів часто утворюється α -D-глюкоза, яка перетворюється в β -D-глюкозу проміжним ферментом – мутаротазою. В принципі α -форма глюкози може перетворитися на β -форму спонтанно, але реакція є надто повільною і для отримання біосенсора з прийнятним часом відгуку додавання мутаротози часто є необхідним.

Один з перших запропонованих амперометричних біосенсорів такого типу містив систему β -галактозидаза-ГОД і призначався для визначення лактози [38]. Біосенсор характеризувався широким лінійним діапазоном – від 0,02 до 3,00 мМ і був успішно застосований для визначення лактози у харчових продуктах та сечі. Відомі і інші біосенсори на основі цієї ферментної системи для визначення лактози [39–45]. Слід відмітити біосенсор, який базувався на визначенні тиску, який створювався в закритій робочій комірці при гідролізі лактози і окисненні глюкози [46]. На роботу даного біосенсора не впливали типові інтерференти, такі як електроактивні речовини або речовини з оптичними властивостями. В одній роботі до складу біоселективного елементу біосенсора було додано мутаротазу [47]. Біосенсори на основі β -галактозидази детально описані в нещодавньому огляді [48].

Більш складні біосенсиори для визначення сахарози містять три ферменти: інвертазу, мутаротазу та ГОД [49–57]. Для покращення стабільності біосенсора і кількості можливих вимірювань при багаторазовому використанні до складу біоселективної мембрани біосенсора в одій з робіт було додано лізоцим [51]. Також для визначення сахарози запропоновано біосенсор на основі інвертази, ГОД та ПХ, який вирізнявся пошаровою іммобілізацією ферментів з використанням афінних взаємодій [58]. Слід відмітити, що біосенсиори на основі цього ж каскаду реакцій (інколи без мутаротазу) були запропоновані для визначення іонів ртуті шляхом інгібіторного аналізу [59–62].

В одній з ранніх робіт було запропоновано гібридний біосенсор для визначення сахарози, який містив стінки дріжджів в якості джерела інвертази і очищену ГОД, а замість мутаротазу використовувались іони фосфорної кислоти, які каталізують ту ж реакцію (хоча і менш ефективно) [63]. Біосенсор був стабільним протягом двох місяців. В схожій роботі також використовувались іони фосфорної кислоти для мутаротації, а інвертаза та ГОД були іммобілізовані в чутливому елементі біосенсора [64].

Замість ГОД в кінці ферментативного каскаду інколи використовується глюкозодегідрогеназа, яка теж окиснює β -D-глюкозу до D-глюконолактону, але при цьому відновлює $\text{НАД}(\text{Ф})^+$ [50]. Недоліком використання даної реакції для розробки біосенсорів є необхідність додавання НАД^+ до робочого буферу і це є обмеженням при розробці амперометричних біосенсорів, оскільки в результаті реакції не утворюється електроактивних продуктів (НАДН можна окиснювати і детектувати, але при надто великому робочому потенціалі). Втім, внаслідок описаних вище спонтанних перетворень глюконолактону відбувається зміна провідності та рН розчину, що дає змогу використовувати рН-чутливі польові транзистори, як наприклад було показано в роботі [65]. При безперервних вимірюваннях, даний біосенсор був

стабільним протягом 20 діб, що є дуже гарним показником. Втім, для вимірювання реальних зразків він не використовувався. Також для визначення сахарози запропоновано двоферментний біосенсор на основі інвертази і фруктозодегідрогенази [66].

Слід відмітити, що, незважаючи на гарні характеристики біосенсорів для визначення вуглеводів (достатню чутливість та лінійний діапазон, високу селективність і успішне використання для досліджень реальних зразків), всі вони мають суттєвий недолік – крім цільового вуглеводу мають чутливість до глюкози. А оскільки ГОД є останньою ланкою в каскаді реакцій, чутливість до глюкози є більшою, аніж чутливість до головного аналіту, і біосенсор генерує сумарний відгук на глюкозу та цільовий вуглевод. Глюкоза є дуже поширеною речовиною як в біологічних, так і в харчових зразках, тому для забезпечення точної роботи біосенсора необхідно або усунути глюкозу при попередній обробці проби, або окремо визначити концентрацію глюкози. В останньому випадку, знаючи концентрацію глюкози у зразку і чутливість мультиферментного біосенсора до глюкози, можливо визначити внесок цільового вуглеводу у сумарний відгук біосенсора і з рештою його концентрацію. На такому принципі базуються масиви біосенсорів, які запропоновані для одночасного визначення декількох вуглеводів [28, 67, 68].

1.2.2. Ферментні каскади для визначення ліпідів

Крім вуглеводів, біосенсорне визначення багатьох груп ліпідів (тригліцеридів, фосфоліпідів, естерів холестеролу) проводиться із використанням мультиферментних систем, оскільки відсутні ферменти для прямого окиснення даних речовин. У випадку тригліцеридів (жирів), необхідно спочатку гідролізувати жир до жирних кислот, після чого можливе визначення гліцеролу біосенсором. Втім, для визначення гліцеролу необхідні

ще дві ферментативні реакції, оскільки гліцеролоксидаза для прямого окиснення гліцеролу існує, але комерційно важкодоступна.

В одній з перших робіт в цьому напрямку було описано біосенсор для визначення тригліцеридів у сироватці крові на основі каскаду з трьох ферментативних реакцій [69]. Триацилгліцерол-ліпаза розщеплювала жири на гліцерол та жирні кислоти. Гліцеролдегідрогеназа окиснювала гліцерол та відновлювала НАД, який, в свою чергу, окиснювався діафорозою з одночасним відновленням медіатору 2,6-дихлорфеноліндофенолу. Останній вже окиснювався на робочому електроді і генерував відгук біосенсора. В даній роботі, лише гліцеролдегідрогеназа та діафораза були іммобілізовані на колагеновій мембрані біосенсора, в той час як триацилгліцерол-ліпазу додавали у вільному вигляді до досліджуваного розчину перед вимірюваннями. Діапазон визначення тригліцеридів складав від 0,1 до 5 г/л, а тривалість аналізу – менше 15 хвилин.

Згодом було запропоновано біосенсори на основі повністю іммобілізованих ферментів, наприклад, ліпази, гліцеролкінази та гліцерол-3-фосфатоксидази [70]. Ліпаза розщеплювала жири з утворенням гліцеролу, гліцеролкіназа фосфорилувала гліцерол (з використанням АТФ) до гліцерол-3-фосфату, який окиснювався гліцерол-3-фосфатоксидазою з утворенням пероксиду водню. Даний біосенсор мав час відгуку лише 40 секунд і був успішно використаний для визначення вмісту тригліцеридів у сироватці крові здорових та хворих людей, з підтвердженням результатів колориметричним методом. При багатократному використанні біосенсора впродовж 25 діб не було зафіксовано зменшення його активності, що свідчить про дуже гарну стабільність іммобілізованих ферментів. Нещодавно біосенсор на основі цієї ж триферментної системи було адаптовано для визначення жирів у підшкірному салі [71]. Для покращення доступності жирів для

ферментативного гідролізу їх було переведено у міцелярну форму за допомогою поверхнево-активної речовини.

Більш детально біосенсиори для визначення тригліцеридів були розглянуті в нещодавньому огляді [72].

Для створення амперометричних біосенсорів для визначення холестеролу можна використовувати холестеролоксидазу, але оскільки холестерол часто перебуває у формі естерів, то до складу біосенсора додають другий фермент – холестеролестеразу, яка від'єднує жирні кислоти від холестеролу і дозволяє біосенсору визначати сумарний рівень холестеролу і його естерів в крові [73–80]. Таке визначення є корисним в медичній діагностиці та харчовій промисловості. Відомий також біосенсор, в якому замість холестеролоксидази використовували холестеролдегідрогеназу, а сигнал детектували амперометрично через медіатор [81]. Більш детально інформація про холестерол-чутливі біосенсиори наведено в огляді [82].

1.2.3. Ферментні каскади для визначення пептидів і протеїнів

Біосенсиори для визначення пептидів та протеїнів базуються на кількох послідовних ферментативних реакціях [83]. Найчастіше використовується каскади з гідролаз та оксидази L-амінокислот для послідовного розщеплення протеїну до амінокислот з наступним їх окисненням [84, 85, 88]. Наприклад, було запропоновано біосенсор для визначення протеїнів на основі трипсину (гідролізував протеїни до пептидів), лейцинової амінопептидази (гідролізувала пептиди до амінокислот) та оксидази L-амінокислот (окиснювала амінокислоти з утворенням пероксиду водню) [33]. Детекція пероксиду водню відбувалась за допомогою платинового електроду при потенціалі +0,65 В (відносно Ag/AgCl електрода порівняння). Було проведено детальні дослідження умов роздільної або одночасної іммобілізації

лейцинової амінопептидази та оксидази L-амінокислот (трипсин іммобілізували в окремій мембрані). Лінійний діапазон визначення казеїну (його використали в якості білкового субстрату) складав 0,1-4 г/л, а час відгуку біосенсора – від 4 до 9 хв., в залежності від концентрації протеїну. При зберіганні біосенсора через місяць відгук зменшився на 20% відносно початкового значення і на 75% через 3 місяці. Слід відзначити, що, через наявність оксидази L-амінокислот, дані біосенсори фактично визначають сумарну концентрацію протеїнів та амінокислот у зразку.

1.2.4. Біосенсори для визначення активності ферментів

Деякі біосенсори на основі каскаду реакцій було використано для визначення активності вільних ферментів. Так, запропоновано двоферментний біосенсор на основі ГОД та мутаротази для визначення активності вільної та іммобілізованої інвертази [86]. Вільна інвертаза розщеплювала сахарозу до глюкози та фруктози, глюкоза вступала в наступні реакції з утворенням в кінці пероксиду водню. Фактично біосенсор був чутливим до α -D-глюкози, але при цьому його можна було використовувати для визначення активності інвертази в лінійному діапазоні від 10 до 70 од.акт. (на 50 мл). Даний біосенсор пропонувалося використовувати для моніторингу ферментативних процесів у харчовій промисловості.

В клінічній діагностиці поширеним є визначення активності біомаркерних ферментів. Наприклад, підвищена активність креатинкінази в сироватці крові є маркером м'язових пошкоджень, зокрема інфаркту міокарду. Креатинкіназа використовує два субстрати (АДФ та креатинфосфат) і утворює два продукти (АТФ та креатин). Для визначення активності цього ферменту було запропоновано біосенсори на основі двох варіантів послідовних ферментативних реакцій, кожна з яких фактично

визначає один із продуктів креатинкінази [87]. В одній послідовності, креатин гідролізувався креатиназою до саркозину та сечовини. Саркозин далі окиснювався саркозиноксидазою до гліцину, формальдегіду та пероксиду водню. В іншій послідовності реакцій АТФ використовувався гліцеролкіназою для синтезу гліцерол-3-фосфату, який, в свою чергу, окиснювався гліцерофосфатоксидазою до дигідроксиацетонфосфату з утворенням пероксиду водню. В обох випадках, пероксид водню детектувався амперометричним шляхом його розкладу на робочому електроді при потенціалі +0,6 В. Для збільшення чутливості електроду до пероксиду водню планарні золоті електроди металізували платиною, а для запобігання впливу інтерферентів використали напівпроникну мембрану на основі поліфенілендіаміну, яка пропускала до поверхні електроду лише пероксид водню і подібні маленькі молекули. Було успішно проведено виміри активності креатинкінази обома варіантами біосенсора, і чутливість біосенсора на основі другої послідовності реакцій виявилася кращою.

В більш пізній роботі для визначення активності КК запропоновано біосенсор на основі гліцеролкінази/гліцерофосфат оксидази, проте з додаванням ПХ та окисно-відновного полімеру на основі осмію (II/III), завдяки чому було знижено робочий потенціал до -100 мВ [89]. При цьому використовували дешеві одноразові перетворювачі, що виготовлялися шляхом вакуумного напилення золотих електродів на підкладку із полікарбонату; в результаті чого, з однієї полікарбонатної пластини отримували 200 перетворювачів з трьома нанесеними електродами на кожному. Робочий та допоміжний електроди металізували платиною. Такий біосенсор був одноразовий, проте демонстрував високу відтворюваність результатів вимірювань. Було досліджено аналітичні характеристики цього біосенсора та проведено вимірювання активності креатинкінази КК в зразку сироватки крові. Слід відмітити, що система

гліцеролкіназа/гліцерофосфатоксидаза також набула поширення в біосенсорах для визначення АТФ [90–94].

Іншими важливими ферментами для клінічної діагностики є аланінамінотрансфераза (АЛТ) та аспартатамінотрансфераза (АСТ), активності яких у крові та співвідношення між ними свідчать про захворювання печінки та серця. Для визначення активності обох ферментів було запропоновано систему з двох біосенсорів [95]. Один з біосенсорів містив піруватоксидазу, яка окиснювала піруват і передавала одержані електрони до електроду через медіатор. Піруват утворювався в результаті реакції трансамінування α -кетоглутарату та аланіну, каталізованої АЛТ, і кількість пірувату була пропорційною активності АЛТ. Для визначення АСТ було застосовано двоферментну систему з оксалоацетатдекарбоксилази та піруватоксидази. АСТ утворювала оксалоацетат в процесі трансамінування аспартату та α -кетоглутарату. Оксалоацетат декарбоксилаза відщеплювала вуглекислий газ від оксалоацетату з утворенням пірувату, який детектувався біосенсором завдяки піруватоксидазі. Таким чином, фактично даний біосенсор визначав загальну активність АСТ та АЛТ, і, знаючи активність АЛТ завдяки першому біосенсору, можливо було вирахувати активність АСТ. Особливістю будови біосенсорів було чітке розташування ферментів шарами на поверхні електроду завдяки покрової імобілізації: спочатку імобілізували один на одного два моношари піруватоксидази, а потім зверху імобілізували третій моношар піруватоксидази у випадку біосенсора для АЛТ або моношар оксалоацетат декарбоксилази у випадку біосенсора для АСТ. Біосенсори було успішно використано для аналізу активностей АСТ та АЛТ в сироватці крові, лінійний діапазон визначення АСТ становив від 30 до 240 од.акт./л, а АЛТ від 43 до 480 од.акт./л.

1.2.5. Використання пероксидази хрону у каскадах реакцій, в яких утворюється пероксид водню

Пероксидаза хрону (ПХ) часто використовується в складі біоселективних елементів біосенсорів, якщо біосенсор містить оксидазу, яка продукує пероксид водню. ПХ виступає останньою ланкою в каскаді реакцій, розщеплюючи пероксид водню і генеруючи електрохімічний сигнал. Використання ПХ дає змогу пришвидшити спонтанну реакцію розкладу пероксиду водню і таким чином зменшити час відгуку біосенсора, а також зрідка збільшити чутливість біосенсора. Так, було запропоновано біосенсор на основі триферментної системи β -галактозидаза-ГОД-ПХ, іммобілізованої за допомогою поліетиленіміну на поверхні скловуглецевих електродів [96]. Біосенсор демонстрував гарну чутливість (нижня межа визначення лактози становила кілька мікромоль/л), швидкий час відгуку (2-4 секунд) і був успішно використаний для визначення лактози в свіжому сирому молоці. Ця ж система використовувалась і в іншій роботі [97]. Ферментна система холестеролоксидаза/холестеролестераза/ПХ була використана і в інших роботах для створення біосенсорів для визначення холестеролу і його естерів [98, 99].

Крім того, ПХ може слугувати як проміжна ланка для передачі електронів між медіаторами та пероксидом водню, зменшуючи таким чином робочий потенціал біосенсора до потенціалу окиснення чи відновлення відповідного медіатора. Зменшення потенціалу, в свою чергу, уповільнює окиснення інтерферентів на поверхні біосенсора і відповідно збільшує селективність і точність аналізу. Наприклад, за цим принципом був розроблений лактат-чутливий біосенсор на основі лактатоксидази, ПХ та медіатору тетратіафульвалену [29]. Біосенсор мав лінійний діапазон в області низьких концентрацій лактату – від 0,42 мкМ до 20 мкМ. Найвища чутливість

біосенсора до лактату спостерігалась при потенціалі -50 мВ (відносно Ag/AgCl електрода порівняння). Нажаль, з'ясувалося, що використаний медіатор також ефективно передає електрони між аскорбіною кислотою та електродом, і відповідно біосенсор не може використовуватись для роботи із зразками, де кількість аскорбінової кислоти співставна з кількістю лактату. Для визначення лактату у винах це не було проблемою, і біосенсор було успішно використано для аналізу 15 зразків вина з підтвердженням результатів комерційним ферментним методом аналізу. Цією ж групою дослідників було запропоновано триферментний біосенсор для визначення гліцеролу на основі гліцеролкінази, гліцерол-3-фосфатоксидази та ПХ із залученням того ж медіатору тетратіафульвалену [30]. В даному випадку був використаний потенціал $+0,0$ В (відносно Ag/AgCl електрода порівняння) і також спостерігали сильну чутливість біосенсора до аскорбінової кислоти, що не завадило визначенню гліцеролу у 12 зразках білого та червоного вина. Даний біосенсор виявився не дуже вдалим – він мав вузький лінійний діапазон визначення гліцеролу (від 1 до 10 мкМ) і погану стабільність при зберіганні (при зберіганні протягом 8 діб відгук зменшувався в 2 рази). Також ПХ була використана для розробки двох подібних біосенсорів для визначення холестеролу та естерів холестеролу [31]. Холестерол-чутливий біосенсор базувався на скловуглецевому електроді, на який іммобілізували ПХ, адсорбовану на золотих наночастинках. Холестеролоксидазу іммобілізували окремо в чашці Петрі в каррагінановому гідрогелі, після чого гідрогелеву плівку фіксували на поверхні електрода. Холестеролоксидаза окиснювала холестерол з утворенням пероксиду водню. ПХ окиснювала пероксид водню та передавала електрони медіатору (ферроцену або ферроценкарбоновій кислоті), а останній вже передавав їх електроду. Біосенсор для визначення сумарного вмісту холестеролу та естерів холестеролу був дуже схожий, але разом з холестеролоксидазою іммобілізували холестеролестеразу, яка

відщеплювала жирні кислоти від холестеролу, вивільнюючи його для подальшого окиснення. Робочий потенціал становив 0 В (відносно Ag/AgCl електрода порівняння), що теоретично дозволяло усунути окиснення інтерферуючих речовин, але чутливість біосенсорів до інтерферентів, нажаль, не перевіряли. Концентрацію холестеролу і його естерів визначили в зразку цільної крові та виготовленої з неї сироватки, і результати біосенсора співпали з результатами спектрофотометричного методу. Описано біосенсор для визначення лактози, який також використовує перенос електронів від ПХ до тетратіафульвалену [100].

Таким чином, в більшості випадків користь від додавання ПХ і медіатора до складу біосенсора полягає в прискоренні реакції розкладу пероксиду водню і певному покращенні характеристик біосенсора, але використання медіатора і низького прикладеного потенціалу не завжди захищає від впливу інтерферентів. Для біосенсорів на основі платинових електродів, використання ПХ є менш актуальним, оскільки на платиновій поверхні пероксид водню швидко окиснюється і без ПХ [101]. ПХ може передавати електрони окисно-відновним гідрогелям. Наприклад, система ацетилхолінестераза/холінооксидаза/ПХ була використана в біосенсорі для визначення ацетилхоліну [102]. В даній системі ацетилхолінестераза каталізує гідроліз ацетилхоліну до холіну, холінооксидаза окиснює холін з утворенням пероксиду водню, який окиснюється ПХ з передачею електронів до робочого електроду через осмій-вмісний гідрогель. Це дало змогу використати дуже низький робочий потенціал в -50 мВ (відносно Ag/AgCl електрода порівняння). Втім, чутливість біосенсора до інтерферентів не перевіряли. Дана ферментна система також може використовуватись в біосенсорах для детекції різноманітних токсинів, які є інгібіторами ацетилхолінестерази.

Каскади реакцій із кінцевою ПХ застосовуються не тільки в електрохімічних, але й в оптичних біосенсорах. Наприклад, було описано

дуже чутливий оптичний біосенсор для визначення ксантину, який базується на послідовній роботі ксантиноксидази, супероксиддисмутази та ПХ [103]. в Даному випадку, ПХ в присутності пероксиду водню окиснювала безбарвний «Amplex Red» до флуоресцентного резорурфіну. Нижня межа вимірювання ксантину становила 20 нМ, а лінійний діапазон простягався до 3,5 мкМ, що робило його одним з найчутливіших біосенсорів для визначення цієї речовини. Втім, біосенсори на основі інших типів перетворення сигналу (не електрохімічних) виходять за межі даного огляду.

1.2.6. Використання діафрази та НАДН-оксидази у каскадах реакцій, в яких утворюється НАД(Ф)Н

Діафоза є поширеним кінцевим ферментом у біосенсорних ферментативних каскадах. Вона використовується як наступна ланка після ферменту, який продукує НАДН або НАДФН. Слід зазначити, що під назвою «діафоза» насправді міститься два окремі ферменти – НАДН-дегідрогеназа та НАДФН-дегідрогеназа. Діафоза окиснюють НАД(Ф)Н і одночасно відновлюють медіатор, який вже і продукує сигнал біосенсора. Тому діафоза є популярними ферментами в складі біосенсорів на основі НАДН-продукуючих дегідрогеназ, таких як формальдегіддегідрогеназа [104, 105], малатдегідрогеназа [106–108], D-лактатдегідрогеназа [109–113], L-лактатдегідрогеназа [108, 110, 114–116], форміатдегідрогеназа [110], D-сорбітолдегідрогеназа [114, 117], D-глюкозодегідрогеназа [114–116, 118], гліцеролдегідрогеназа [119–121], алкогольдегідрогеназа [115, 122] та інші [123].

Зокрема, було запропоновано біосенсор для визначення малату на основі малатдегідрогенази і діафозази із використанням медіатору тетратіафульвалену [29]. Малатдегідрогеназа окиснювала малат і одночасно

відновлювала НАД⁺. Діафораза окиснювала НАДН і відновлювала тетратіафульвален, який окислювався на робочому електроді при потенціалі +100 мВ (відносно Ag/AgCl електрода порівняння). Лінійний діапазон визначення малату становив від 0,52 мкМ до 20 мкМ. Втім, недоліком біосенсора було ефективне окиснення аскорбінової кислоти медіатором з передачею електронів до робочого електроду, причому чутливість біосенсора до цієї кислоти була в кілька разів більшою за чутливість до малату. Незважаючи на це, було визначено концентрацію малату у 9 зразках вина.

Також слід згадати використання діафрази в біосенсорах для визначення токсичних речовин на основі інгібіторного аналізу. Наприклад, для визначення фунгіцидів манебу та зінебу запропоновано амперометричні біосенсори, які містять альдегіддегідрогеназу і діафразу [124, 125]. Медіатором виступав гексаціаноферрат (III), який відновлювався діафразою до гексаціаноферрату (II), а останній окиснювався на платиновому електроді. При наявності в зразку фунгіциду він інгібував альдегіддегідрогеназу і відгук біосенсора на пропіоновий альдегід зменшувався.

Альтернативою для діафрази є НАДН-оксидаза, яка окиснює НАДН (а також в ряді випадків і НАДФН) до НАД⁺ з утворенням пероксиду водню, який і детектується [126–128]. Кількість описаних біосенсорів на основі цього ферменту є значно меншою, аніж біосенсорів з діафразою. Наприклад, запропоновано біосенсор для визначення гідроксиметилфурфуралу (альдегіду, концентрація якого слугує показником якості меду) на основі альдегіддегідрогенази і НАДН-оксидази або діафрази [129]. Втім, в даній роботі характеристики біосенсора на основі діафрази виявились кращими. В іншій роботі ця ж система була використана для створення біосенсора для визначення ацетальдегіду в вині [130]. Для визначення активності ліпази і концентрації жирів використано біосенсор на основі гліцеролдегідрогенази та НАДН-оксидази [131]. Для визначення жовчних кислот і їхніх естерів у сечі

людини запропоновано біосенсор на основі триферментної системи з сульфатази сульфатів жовчних кислот, бета-гідроксистероїддегідрогенази та НАДН-оксидази [132].

1.2.7. Інші біосенсори на основі каскадів ферментативних реакцій

Для визначення цитрату у харчових зразках та ферментативному «бульйоні» (продукти ферментації *Claviceps purpurea*) було запропоновано біосенсор на основі цитратліази (розщеплювала цитрат до оксалоацетату й ацетату), оксалоацетат декарбоксилази (розщеплювала оксалоацетат до пірувату та вуглекислого газу) та піруватоксидази (окиснювала піруват з утворенням пероксиду водню і поглинанням кисню), які були ко-імобілізовані у желатиновій мембрані [32]. Використовувався платиновий електрод, до якого прикладали потенціал +0,6 В для детекції пероксиду водню або -0,6 В (відносно Ag/AgCl електрода порівняння) для детекції зменшення концентрації кисню (обидва варіанти показали приблизно однакові результати). Нижня межа визначення цитрату становила 0,5 мкМ, а лінійний діапазон – від 1 мкМ до 1 мМ. Концентрація цитрату була визначена в різних харчових продуктах (соках, пюре та соусі) та ферментативному «бульйоні» (продукту ферментації *Claviceps purpurea*) і була підтверджена фотометричним методом визначення цитрату. Оскільки біосенсор був чутливим не тільки до цитрату, а і до оксалоацетату і пірувату, концентрації останніх двох речовин у зразках визначали додатковим біосенсором без цитратліази, а потім отримані результати враховували при роботі цитратного біосенсора. Стабільність біосенсора при зберіганні була досить низькою – відгуки біосенсора зменшились на 75% через 18 діб, навіть при додатковій реактивації цитратліази (ймовірно, що зберігання лімітувалось піруватоксидазою).

Для визначення амінокислоти аргініну було запропоновано низку біосенсорів на основі двоферментної системи аргіназа-уреаза [133]. Аргіназа розщеплює аргінін до орнітину та сечовини, а уреаза розщеплює сечовину до двох іонів амонію та іону карбонатної кислоти. В процесі уреазної реакції відбувається зміна рН та провідності розчину, що дає змогу створювати кондуктометричні біосенсори для визначення аргініну [134, 135]. Для розробки амперометричних біосенсорів на основі цих ферментів використано амоній-чутливі електроди [136].

Для визначення АТФ запропоновано два біосенсори на основі іммобілізованих *n*-гідроксибензоатгідроксилази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та гексокінази [137]. За наявності в розчині АТФ гексокіназа утворювала глюкозо-6-фосфат, а глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа окиснювала дану речовину і утворювала НАДФН. За наявності останнього, *n*-гідроксибензоатгідроксилаза гідроксильовала *n*-гідроксибензоат до електрохімічно активного продукту і використовувала при цьому кисень. Це дозволило використати два типи перетворювачів – кисневий електрод типу Кларка та електрохімічний друкований електрод. За аналогічним принципом працюють інші АТФ-чутливі біосенсори на основі саліцилатгідроксилази, глюкозо-6-фосфатдегідрогенази та гексокінази, іммобілізованих на таких самих електродах тією ж групою дослідників [138].

Одним з перших біосенсорів на основі чотирьох послідовних ферментавних реакцій був біосенсор для визначення АМФ та іонів фосфорної кислоти [139]. В присутності обох цільових речовин, глікогенфосфорилаза проводила розщеплення глікогену з утворенням глюкозофосфату. Іони фосфорної кислоти були субстратом глікогенфосфорилази, а АМФ – алостеричним активатором. Глюкозофосфат детектувався за допомогою триферментної системи з лужної фосфатази (від'єднувала фосфорну групу від глюкозофосфату з утворенням α -D-глюкози), мутаротази (перетворювала α -

D-глюкозу на β - D-глюкозу) та ГОД (окиснювала глюкозу з утворенням пероксиду водню, який і детектувався). Підбираючи склад робочого буферу, можливо було визначати АМФ у діапазоні концентрацій від 5 до 150 мкМ, а іонів фосфорної кислоти - від 0,05 до 1 мМ. Крім того, була показана можливість визначення активності глюкогенфосфорилази в діапазоні від 0,005 до 0,200 од.акт./мл. Нажаль, стабільність біосенсора не досліджували.

На сьогодні найбільш складні ферментні каскади, які використовувались в основі роботи біосенсорів, що було описано, містили п'ять ферментів. Так, відомий біосенсор для визначення гліцеролу, що містив систему з п'яти ферментів у складі біоселективного елемента: гліцеролкіназа/креатинкіназа/креатиназа/саркозиноксидаза/ПХ [140]. Схема роботи даного біосенсора наведена на рис. 1.1.

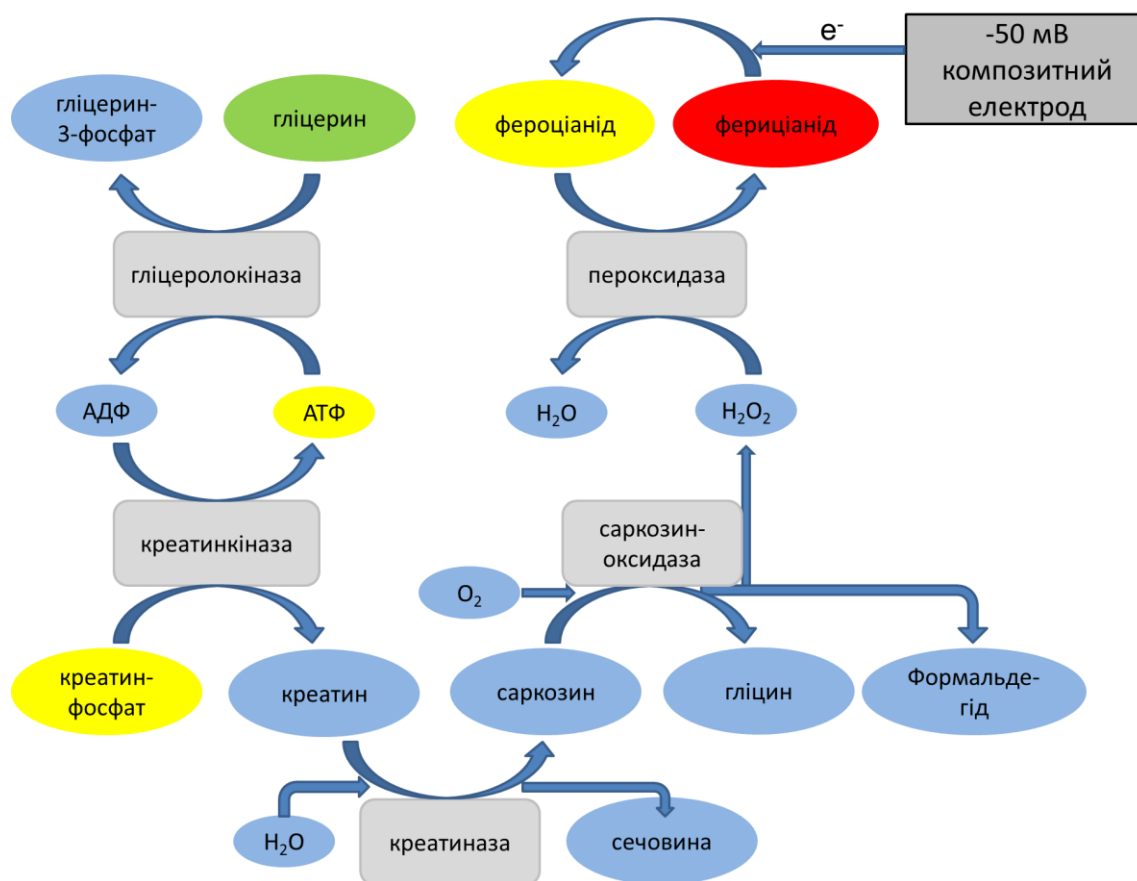


Рис. 1.1. Схема роботи біосенсора для визначення гліцеролу на основі п'яти послідовних ферментативних реакцій [140].

Біосенсор мав досить гарні аналітичні характеристики, зокрема нижню межу визначення гліцеролу в 2 мкМ, лінійний діапазон - від 5 до 640 мкМ і не втрачав чутливості протягом 90 послідовних відгуків. Біосенсор було успішно використано для аналізу гліцеролу у різних зразках білого та червоного вина. Втім, заявлена авторами тривалість зберігання біосенсора виглядає дуже сумнівною (втрата 10% активності після зберігання протягом 15 місяців при кімнатній температурі), оскільки є практично недосяжною для біосенсорів із навіть дуже стабільними ферментами, в той час як використана в каскаді креатинкіназа є дуже нестабільною і швидко інактивується навіть у морозильній камері [141]. Це ставить під сумнів і інші результати даної роботи.

Схожий біосенсор із довгим ланцюжком послідовних ферментативних і неферментативних реакцій для визначення креатиніну було запропоновано в роботі [142]. Цільовий субстрат (креатинін) послідовно гідролізувався креатиніназою і креатиназою до саркозину, який, в свою чергу, окиснювався саркозиноксидазою з утворенням формальдегіду, гліцину та пероксиду водню. Останній відновлювався ПХ з одночасним окисненням ферроцену до катіону ферриценіуму, який відновлювався при потенціалі 0,0 В (відносно Ag/AgCl електрода порівняння) на композитному електроді з суміші тефлонової пасти, золотих наночастинок та багат шарових вуглецевих нанотрубок. Використання такої складної послідовності реакцій дало змогу зробити дуже чутливий біосенсор (нижня межа визначення – 0,1 мкМ), на роботу якого практично не впливали інтерферуючі речовини завдяки нейтральному потенціалу робочого електрода. Недоліком біосенсора була чутливість до креатину, який також присутній у сироватці крові у високій концентрації. Втім, автори не обговорювали це питання і біосенсор було успішно використано для визначення креатиніну у сироватці крові людини. Зберігання біосенсора протягом 2 тижнів призвело до втрати ним близько

50% активності, проте цей показник ймовірно можна значно покращити, змінюючи умови зберігання.

Нетиповий біосенсор для визначення амігдалину (сполуки, що зумовлює токсичність низки фруктових кісточок, зокрема мигдалю) було запропоновано в роботі [143]. Біосенсор містив три ферменти, два з яких каталізували послідовну реакцію – β -глюкозидаза розщеплювала амігдалин до глюкози та манделонітрилу, а манделонітрил-ліаза розщеплювала манделонітрил до бензальдегіду та ціановодню. Разом з даними ферментами була іммобілізована ПХ, яка за наявності у розчині аскорбінової кислоти та пероксиду водню (їх додавали до робочого буферу у достатній концентрації) каталізувала окиснення аскорбінової кислоти з одночасним відновленням пероксиду водню. Ця реакція призводила до зміни рН розчину, яка реєструвалася іон-селективним польовим транзистором (ІСПТ). За наявності амігдалину відбувалось утворення ціановодню, який інгібував ПХ. Таким чином, відгук біосенсора зменшувався пропорційно концентрації амігдалину в діапазоні від 10 до 300 мкМ. Слід відмітити дуже швидке інгібування ПХ – вже через хвилину після додавання амігдалину спостерігався максимальний рівень інгібування. Даний біосенсор пропонується для проведення контрольних вимірювань вмісту амігдалину і подібних компонентів у харчових продуктах.

1.3. Біосенсори на основі циклічних ферментативних реакцій і повторного використання субстрату

Збільшення чутливості біосенсорів є однією з найбажаніших цілей при розробці ферментних біосенсорів. Це пояснюється дуже маленькою (субмікромолярною) концентрацією багатьох важливих аналітів, в той час як нижня межа визначення речовин звичайними ферментними біосенсорами

зазвичай знаходиться в межах 1-100 мікромоль/л. Одним з підходів для визначення більш низьких концентрацій речовин є повторне використання субстрату, яке досягається завдяки циклічним ферментативним реакціям, в яких субстрат багаторазово використовується та регенерується. Такі біосенсори інтенсивно досліджувались групою Ф. Шеллера в Німеччині у 80-х – 90-х роках. Вони ж в 1993 році написали перший огляд, присвячений даній темі [144]. Приклади біосенсорів, на основі циклічних ферментативних реакцій та конкуренції ферментів за субстрат, наведено в табл. 1.2.

Таблиця 1.2

Приклади біосенсорів, які використовують циклічні ферментативні реакції та конкуренцію ферментів за субстрат

Цільова речовина	Тип перетворювача	Ферментативні реакції	Пропоноване використання	Джерело
Глутамат	Графітовий електрод	ГД: $L\text{-глутамат} + \text{НАД}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \alpha\text{-кетоглутарат} + \text{NH}_4^+ + \text{НАДН}$ Аланін аміотрансфераза: $\alpha\text{-кетоглутарат} + L\text{-аланін} \rightarrow L\text{-глутамат} + \text{піруват}$	Немає даних	[145]
L-фенілаланін	Графітовий пастовий електрод	L-фенілаланіндегідрогеназа: $L\text{-фенілаланін} + \text{H}_2\text{O} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{фенілпіруват} + \text{NH}_3 + \text{НАДН} + \text{H}^+$ саліцилатгідроксилаза: $\text{саліцилат} + \text{НАДН} + 2\text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{катехол} + \text{НАД}^+ + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ Тирозиназа: $\text{катехол} + \text{O}_2 \rightarrow \text{хінон} + \text{H}_2\text{O}$	діагностика фенілкетонурії	[146]
Лактат	Електрод на основі оксида індіяолова	ЛОД: $\text{лактат} + \text{O}_2 \rightarrow \text{піруват} + \text{H}_2\text{O}_2$ ЛД: $\text{піруват} + \text{НАДН} \rightarrow \text{лактат} + \text{НАД}^+$	медицина та біотехнологія	[147]

Катехол-аміни	Кисневий електрод	лакказа: катехоламін + O ₂ → хінон + H ₂ O глюкозодегідрогеназа: β-D-глюкоза + хінон → глюконолактон + катехоламін	Імуноферментні аналізи	[148]
Фосфат	Платиновий електрод	Мальтозофосфорилаза: малтоза + фосфат → α-D-глюкоза + β-D-глюкоза-1-фосфат кисла фосфатаза: β-D-глюкоза-1-фосфат + H ₂ O → β-D-глюкоза + фосфат мутаротаза: α-D-глюкоза → β-D-глюкоза ГОД: β-D-глюкоза + O ₂ → D-глюконолактон + H ₂ O ₂	Моніторинг водних забруднень	[149]
АТФ	Кисневий електрод	ГК: β-D-глюкоза + АТФ → глюкоза-6-фосфат + АДФ ГОД: β-D-глюкоза + O ₂ → D-глюконолактон + H ₂ O ₂	Біологічні дослідження	[150]
АТФ	Графітовий електрод	целлобіозодегідрогеназа: β-D-глюкоза → D-глюконолактон + e ⁻ ГК: β-D-глюкоза + АТФ → глюкоза-6-фосфат + АДФ піруваткіназа: фосфоенолпіруват + АДФ → піруват + АТФ	Біологічні дослідження	[151]

Примітки: 1 - ГД – глутаматдегідрогеназа; 2 - ГК – гексокіназа; 3 - ЛД – лактатдегідрогеназа; 4 - ЛОД – лактатоксидаза.

Одним з перших біосенсорів на основі такого підходу був описаний в 1986 році біосенсор для визначення глутамату на основі глутаматдегідрогенази та глутамат-піруват-трансамінази (нині відомої як аланінамінотрансфераза), схема роботи якого наведена на рис. 1.2 [145]. Глутаматдегідрогеназа окиснювала глутамат з одночасним дезамінуванням до α-кетоглутарату, і відновлювала НАД. В свою чергу, аланінамінотрансфераза повторно синтезувала глутамат з α-кетоглутарату шляхом перенесення

аміногрупи від аланіну, причому без використання НАДН. Таким чином, за наявності в розчині глутамату і аланіну (останній – у надлишку) починалася циклічна реакція. Завдяки повторному використанню глутамату глутаматдегідрогеназа утворювала значно більшу кількість НАДН, ніж було б можливим при однонаправленій реакції. Два методи детекції були використані, в одному методі НАДН напряму окислювався на робочому електроді (нижня межа визначення глутамату становила 0,5 мкМ), а в другому методі (на рисунку не наведено) НАДН окиснювався киснем за допомогою медіатора, і падіння концентрації кисню детектували кисневим електродом (межа визначення глутамату становила 0,1 мкМ). Отримана чутливість біосенсора значно перевищувала тогочасні аналоги.

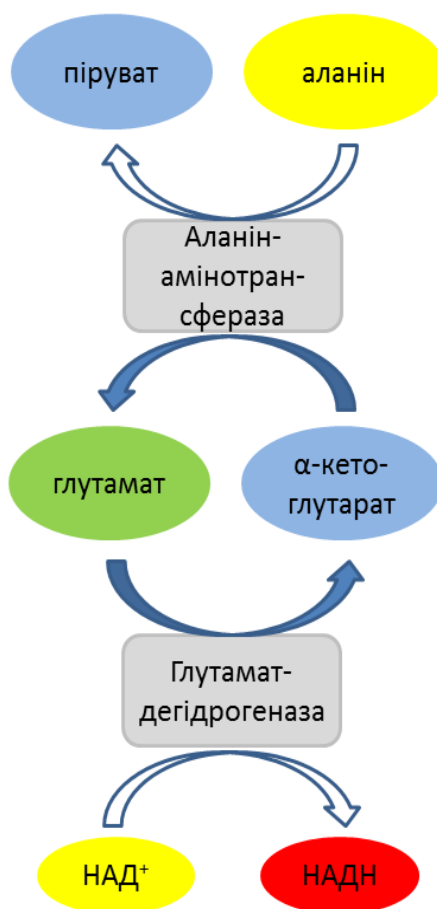


Рис. 1.2. Схема послідовних ферментативних реакцій, що лежать в основі роботи біосенсора для визначення глутамату [145].

Принцип повторного використання субстрату було застосовано для біосенсора для визначення L-фенілаланіну з метою діагностики спадкового захворювання фенілкетонурії [146]. Біосенсор базувався на каскаді з трьох ферментативних реакцій, але оскільки важливою особливістю біосенсора було повторне використання субстрату, то його буде розглянуто в даному розділі. L-фенілаланіндегідрогеназа окиснювала L-фенілаланін до фенілпірувату з одночасним відновленням НАД⁺ до НАДН. Останній використовувався саліцилатгідроксилазою для синтезу катехолу з саліцилату. Третій фермент, тирозиназа, окиснювала катехол до хінону з використанням кисню. Хінон відновлювався назад до катехолу на робочому електроді при потенціалі -50 мВ (відносно Ag/AgCl електрода порівняння) – ця реакція і генерувала відгук біосенсора. Утворений катехол знову окиснювався тирозиназою, і фактично відбувалося багатократне окиснення однієї і тієї ж молекули на поверхні електроду, що призводило до значного зростання чутливості біосенсора. В порівнянні з біосенсором без тирозинази (пряме окиснення катехолу на електроді), повторне використання катехолу збільшило чутливість біосенсора до НАДН у 33 рази. Нижня межа визначення фенілаланіну становила 5 мкМ, а лінійний діапазон – від 20 до 150 мкМ. Завдяки невеликому робочому потенціалу, біосенсор був успішно протестований з зразками сироватки та навіть цільної крові. Втім, автори зазначають, що присутність фізіологічної концентрації аскорбінової кислоти (200 мкМ) призводить до зниження чутливості біосенсора на 14%, і також можлива інтерференція від парацетамолу. Слід відмітити, що дана система може бути використана для розробки інших високочутливих біосенсорів на основі дегідрогеназ.

Для визначення лактату був описаний біосенсор на основі лактатоксидази та лактатдегідрогенази. В присутності достатньої концентрації кисню та НАДН відбувалося циклічне перетворення лактату на

піруват і навпаки, з утворенням пероксиду водню лактатоксидазою [147]. Даний біосенсор цікавий тим, що використання циклічної системи хоча і призвело до збільшення чутливості, але при цьому біосенсор став реагувати на другий субстрат, що часто трапляється у зразках (піруват). Фактично, було отримано біосенсор для одночасного визначення концентрації лактату та пірувату, проте розрізнити вміст даних речовин немає можливості. Це обмежує використання біосенсора зразками, в яких лише один з субстратів присутній у великій кількості.

Двоферментний біосенсор з залученням повторного використання субстрату було запропоновано для визначення катехоламінів у дуже низьких концентраціях (нано- та пікомолярний діапазон). Лакказа окиснювала катехоламін до відповідного хінону. Детекція реакції відбувалася шляхом вимірювання концентрації кисню, який використовувався лакказою при каталізі. Хінон виступав акцептором електронів під час каталізу окиснення глюкози глюкозодегідрогеназою, що забезпечувало повернення субстрату до вихідного стану і його повторне використання. В першій роботі було досліджено визначення *p*-амінофенолу даним біосенсором з нижньою межею визначення 100 пМ [148]. За оптимальних умов (у сухому стані при +4°C) біосенсор зберігався місяць без втрати активності. Втім, лакказа є відносно неселективним ферментом і здатна окиснювати широкий ряд сполук. Зокрема, біосенсор ефективно детектував у діапазоні 5-200 нМ адреналін, норадреналін, L-діоксифенілаланін, ферроценоцтову кислоту, ферроценкарбонову кислоту, та ін. Зважаючи на таку неселективність, запропоновану ферментну систему було запропоновано використовувати як детектуючий компонент в імунологічних методах аналізу. В наступній роботі було адаптовано біосенсор для визначення адреналіну, норадреналіну та дофаміну [152]. Межа визначення адреналіну становила 0,5 нМ. Було виявлено вплив на біосенсор фізіологічних концентрацій аскорбінової та

сечової кислот, що ускладнює практичне застосування біосенсора для вимірювань у біологічних зразках (автори запропонували попередньо усувати дані речовини додаванням до зразку відповідних ферментів). В нещодавній роботі було використано генетично модифіковану лакказу, з підвищеною стабільністю та здатну працювати в широкому діапазоні рН [153]. Втім, головну проблему – низьку селективність біосенсора – вирішено не було.

Біосенсор на основі схожої системи було використано для визначення сумарної концентрації фенольних сполук в роботі [154].

Поєднання циклічних та каскадних реакцій було використано для створення фосфат-чутливого біосенсора на основі чотирьох ферментів (рис. 1.3) [149]. Мальтозофосфорилаза в присутності фосфату розщеплювала мальтозу до α -D-глюкози та β -D-глюкозофосфату. Кисла фосфатаза розщеплювала утворений глюкозофосфат до β -D-глюкози та фосфату, таким чином регенеруючи молекулу фосфату для наступного циклу. Мутаротаза перетворювала α -D-глюкозу в β -форму, і ГОД окиснювала утворені 2 молекули β -D-глюкози з утворенням пероксиду водню, який і детектувався амперометричним платиновим електродом. Таким чином, поєднання кількох ферментів забезпечувало подвоєння сигналу біосенсора за рахунок утворення двох молекул глюкози, а також багатократно збільшувало сигнал за рахунок циклічного використання фосфату. Завдяки цьому, було досягнуто мінімальну межу визначення фосфату в 10 нМ, що є дуже гарним результатом для ферментних біосенсорів. Лінійний діапазон визначення фосфату був від 0,1 до 1 мкМ. Для зменшення вартості і складності даного біосенсора, було розроблено аналогічний біосенсор, але без кислій фосфатази і відповідно без повторного використання субстрату [34]. Це призвело до погіршення нижньої межі визначення біосенсора та зсуву його лінійного діапазону в бік більш високих концентрацій фосфату – від 1 до 50 мкМ, що говорить про значний вплив кислій фосфатази на характеристики біосенсора.

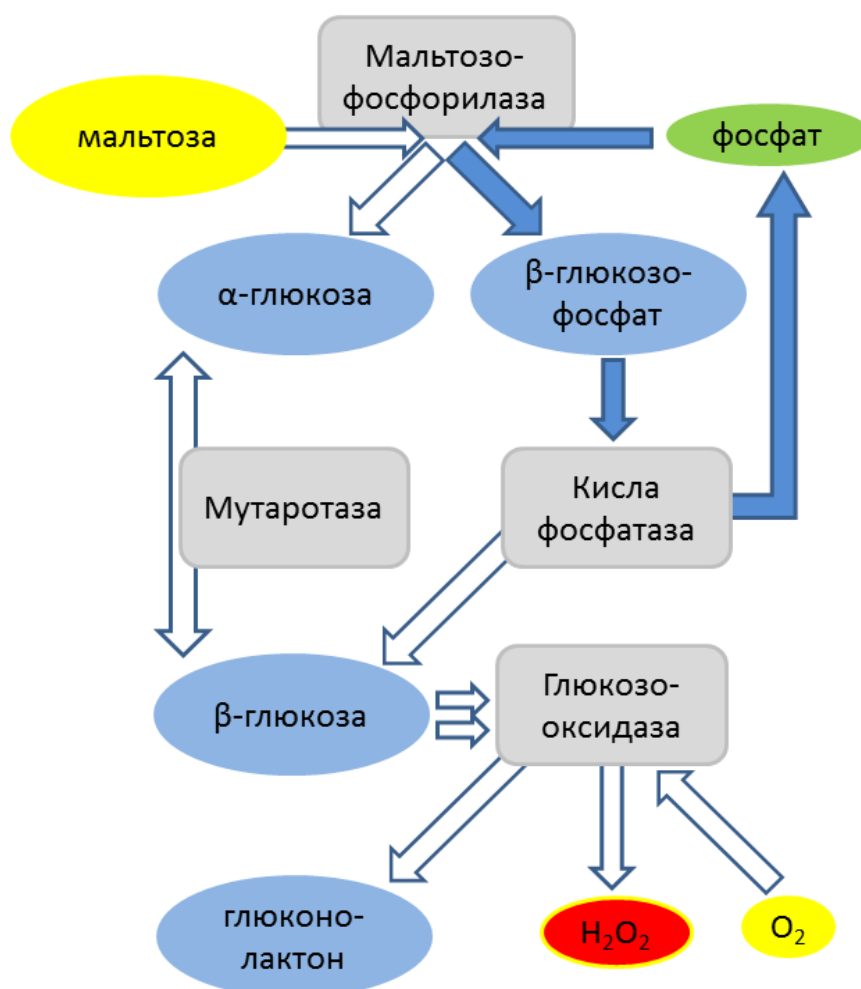


Рис. 1.3. Схема ферментативних реакцій, які лежать в основі роботи біосенсора для визначення фосфату [149].

Були запропоновані і інші біосенсори на основі циклічних ферментативних реакцій, наприклад, були використані системи глюкозодегідрогеназа/ПХ (повторне використання НАД^+), ГОД/глюкозодегідрогеназа (повторне використання глюкози), цитохром b2/лактатдегідрогеназа (повторне використання пірувату) [155]. Теоретичні та практичні основи повторного використання субстрату для чутливості біосенсора були детально розглянуті в розбитій на три частини роботі, присвяченій біосенсору для визначення катехолу та фенолу [156, 157]. Хоча даний біосенсор базувався на одному

ферменті і тому виходить за рамки даного огляду, принцип його роботи полягає у циклічному окисненні катехолу до хінону і зворотньому відновленні хінону, що робить його близьким до описаних в даній частині мультиферментних біосенсорів. Проведений при розробці даного біосенсора теоретичний та практичний аналіз (включаючи вплив на роботу біосенсора дифузійних процесів, кінетики ферментативної реакції та кінетики транспорту електронів, проникності мембрани, тощо) може бути корисним для розробки інших біосенсорів на основі повторного використання субстрату.

1.4. Біосенсори на основі конкуренції ферментів за субстрат

Не завжди вдається підібрати декілька ферментів таким чином, щоб вони послідовно каталізували реакції з утворенням електрохімічно активного продукту. Іноколи існують два ферменти для одного субстрату, один з яких генерує електроактивний продукт, а інший – ні. Ідея наступного варіанту мультиферментних біосенсорів полягає в тому, що обидва ферменти в складі біоселективного елементу будуть конкурувати за субстрат. Типовим прикладом таких біосенсорів є біосенсори для визначення АТФ, які базуються на системі глюкозооксидаза/гексокіназа [158]. Гексокіназа (ГК) використовує АТФ для фосфорилування глюкози до глюкозо-6-фосфату і відповідно зменшує концентрацію глюкози в приелектродному шарі біосенсора (рис. 1.4). ГОД паралельно окиснює глюкозу і продукує пероксид водню, який і детектується за допомогою електрохімічного перетворювача. Чим більшою є концентрація АТФ у розчині, тим більше глюкози буде фосфорильовано ГК за одиницю часу і тим менше пероксиду водню буде утворено ГОД.

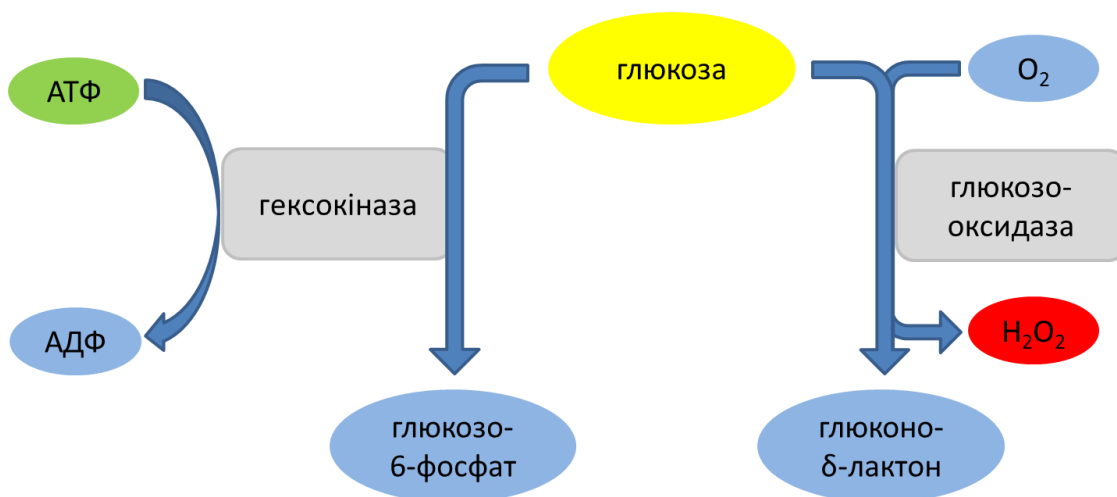


Рис. 1.4. Принцип роботи біосенсорів для визначення АТФ на основі конкуренції ферментів за глюкозу [158].

Біосенсори на основі даної ферментної системи використовують як перетворювачі платинові електроди [159, 160], скловуглецеві електроди [161], платинові мікроелектроди [162–165], та інші [166]. Найкращої чутливості до АТФ було досягнуто при використанні біосенсора на основі скловуглецевих електродів. Діапазон визначення АТФ складав 0,5-20 мкМ, а при зберіганні біосенсора 22 доби у 0,1 М фосфатному буфері, рН 7,4, при 4°C він втратив лише 35% своєї активності. Біосенсори на основі платинових електродів мали більш широкий діапазон визначення АТФ (50-500 мкМ [159] та 10-200 мкМ [160]), проте були менш стабільними при зберіганні (втрата активності – 60% вже після 2 тижнів). Щоб уникнути окислення електроактивних речовин, поверхню електродів покривали мембраною на основі поліфенілендіаміну, яка забезпечувала дифузію до електроду пероксиду водню, проте не пропускала більші за розміром молекули. Концентрація АТФ у реальних зразках (гемолізат еритроцитів людини [159] та тканини шлунково-кишкового тракту [163]) була оцінена, що показує, що система ГОД/ГК є достатньо ефективною.

Головною проблемою таких біосенсорів є залежність чутливості біосенсора до АТФ від концентрації глюкози. АТФ необхідно визначати передусім в біологічних зразках, в яких концентрація глюкози зазвичай лежить в межах кількох мМ. Відповідно, концентрації АТФ можна визначати також в міллімолярному діапазоні, оскільки зменшення відгуку біосенсора при наявності в розчині мікромолярних концентрацій АТФ в даному випадку буде складати доли відсотка. Крім того, концентрація глюкози має бути стабільною і відомою протягом вимірювань, оскільки чутливість біосенсора до АТФ різна за різних концентрацій глюкози в аналізованій пробі. Все це значно обмежує практичне використання даних біосенсорів.

Біосенсори на основі конкуренції ферментів за субстрат не обмежуються визначенням лише АТФ. Так, в 1986 році було описано біосенсор для визначення активності біомаркерного ферменту креатинкінази [167]. Даний амперометричний біосенсор базувався на двоферментній системі гексокіназа/ГОД, проте іммобілізовано було лише ГОД, а гексокіназу додавали до робочої комірки окремо (ймовірно це пояснюється втратою активності гексокінази при іммобілізації, оскільки вона є значно менш стабільною за ГОД). За наявності в розчині субстратів (АДФ та креатинфосфату) креатинкіназа продукувала АТФ та креатин. Відгук біосенсора зворотно залежав від активності креатинкінази: чим вона була більшою, тим меншим був відгук біосенсора через зниження концентрації глюкози внаслідок гексокіназної реакції, як було описано вище. В роботі було вперше описано принципову можливість визначення активності креатинкінази (КК) шляхом визначення кількості АТФ, що продукується в ході реакції за допомогою біосенсора. Однак, варто зазначити, що метою роботи було доведення роботи каскаду ферментативних реакцій креатинкіназа/гексокіназа/ГОД, тому автори не досліджували аналітичні характеристики біосенсора та не пропонували методикку визначення

активності креатинкінази в реальних зразках. Нещодавно було описано аналогічний біосенсор, але вже на основі ко-імобілізованих гексокінази та глюкозооксидази і запропоновано методику визначення креатинкінази в сироватці крові [141].

Альтернативною системою для визначення АТФ, яка також базується на конкуренції двох ферментів за глюкозу, є глюкозодегідрогеназа/гексокіназа [168]. Також нещодавно було запропоновано альтернативну систему для створення АТФ-чутливого біосенсора на основі трьох ферментів [151]. Особливістю такого біосенсора було поєднання конкуренції ферментів за субстрат і повторного використання субстрату. Целобіозодегідрогеназа (мутована, з підвищеною специфічністю до глюкози) окиснювала глюкозу і напряду передавала електрони до робочого електроду. З іншого боку, гексокіназа фосфорилувала глюкозу шляхом переносу фосфатної групи від АТФ. Таким чином, збільшення концентрації АТФ призводило до зменшення концентрації глюкози, доступної для окиснення целобіозодегідрогеназою. Піруваткіназа забезпечувала повторне використання АТФ – утворений гексокіназою АДФ фосфорилувався назад до АТФ шляхом переносу фосфатної групи від фосфоенолпірувату. В порівнянні з іншими біосенсорами для визначення АТФ, даний біосенсор використовував знижений робочий потенціал (-100 мВ), не мав потреби в кисні для роботи, і характеризувався підвищеною чутливістю до АТФ. Нижня межа визначення АТФ становила 63,3 нМ, що значно перевищує біосенсори на основі системи гексокіназа/ГОД, які можуть визначати АТФ зазвичай в концентраціях не нижче 1 мкМ. Недоліком була поява чутливості до АДФ – він вступав в цикл гексокіназа/піруваткіназа так само, як і АТФ, однак чутливість біосенсора до АДФ була вдвічі меншою, ніж до АТФ.

1.5. Біосенсори на основі незалежних ферментативних реакцій

Інколи зустрічаються біосенсори, які містять кілька працюючих незалежно ферментів. В такому випадку одна ферментативна реакція забезпечує детекцію речовини, а інша реакція – зменшення концентрації небажаної речовини, присутність якої заважає вимірюванням. Прикладом такого підходу є використання аскорбатоксидази – ферменту, який перетворює електроактивну аскорбінову кислоту на електрохімічно стабільну дегідроаскорбінову кислоту. Таким чином, аскорбінова кислота розщеплюється ферментом раніше, ніж дифундує до електроду і окиснюється на ньому. Це дозволяє проводити вимірювання в біологічних рідинах, які часто містять аскорбінову кислоту. Цей підхід було використано при розробці амперометричних мікробіосенсорів для визначення лактату, глютамату та глюкози на основі іммобілізованих відповідних оксидаз [169]. В цій роботі селективність біосенсора забезпечувалась напівпроникною мембраною на основі поліфенілендіаміну, проте навіть з мембраною залишалась невелика чутливість електроду до аскорбінової кислоти; ця чутливість повністю зникла після ко-іммобілізації аскорбатоксидази в складі біоселективного елементу біосенсора. Вирогідно, що активності аскорбатоксидази не достатньо, щоб повністю окиснити аскорбінову кислоту, проте робота фермента зменшувала локальну концентрацію кислоти до такого рівня, який вже міг блокуватися фенілендіаміновою мембраною.

В іншій роботі аскорбатоксидаза була застосована для покращення селективності лактат-чутливого біосенсора на основі лактатоксидази [170]. Втім, при роботі аскорбатоксидази спостерігалось значне зменшення концентрації розчиненого кисню, необхідного для роботи лактатоксидази, тому до складу біосенсора було додано церієві наночастинки, які, ймовірно, абсорбували кисень і слугували його джерелом під час проведення аналізу.

Застосування аскорбатоксидази з цією ж метою описано і в інших роботах, часто у комбінації з позитивно-зарядженим полімером поліетиленіміном, який зменшував вплив позитивно заряджених інтерферентів [171–176]. Втім, можна і не включати аскорбатоксидазу до складу біосенсора, а проводити попередню обробку зразку даним ферментом перед аналізом, додаючи його до зразку або ж пропускаючи зразок через колонку з даним ферментом [177, 178].

Для зменшення впливу сечової кислоти на роботу амперометричного біосенсора було запропоновано додатково іммобілізувати уріказу, яка розщеплює дану сполуку [179]. Втім, даний метод не набув поширення, оскільки уріказа утворює пероксид водню, який генерує сигнал в більшості електрохімічних біосенсорів.

Іншою метою використання кількох незалежних ферментативних реакцій є розширення спектру речовин, які можуть визначатися біосенсором. Так, було створено біосенсор на основі ко-іммобілізованих уреазы, ПХ, та бутирилхолінестеразы для визначення широкого спектру токсичних речовин [180]. Різні ферменти інгібуються різними токсикантами, тому за допомогою трьох ферментів біосенсор міг детектувати іони важких металів (інгібують уреазу), ціаніди (інгібують пероксидазу), та пестициди (інгібують бутирилхолінестеразу). Оскільки всі три ферменти мають різні субстрати, то додаючи субстрати окремо, можна було визначати рівень інгібування кожного ферменту і з певною точністю визначати присутність окремих токсинів. За допомогою одноферментного біосенсора такий широкий спектр токсичних речовин визначити було б неможливо. Втім, оскільки ферменти інгібуються все ж досить широким спектром токсикантів з різною чутливістю до кожного токсиканта, точну концентрацію токсичних речовин можна визначити лише в модельних розчинах з єдиним і відомим інгібітором, а в

сумішах і реальних зразках ферментні біосенсиори більш придатні для визначення загальної токсичності розчину.

1.6. Висновки до розділу 1

В огляді розглянуто принципи створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів та їх використання в різноманітних галузях. Найбільшою групою даних біосенсорів є біосенсиори на основі каскадних ферментативних реакцій, які розробляються в першу чергу для розширення діапазону використання електрохімічних біосенсорів. Біосенсиори на основі циклічних ферментативних реакцій і повторного використання субстрату є менш поширеними через меншу кількість можливих комбінацій ферментів, але вони характеризуються найкращою чутливістю серед електрохімічних ферментних біосенсорів.

З іншого боку, показано, що присутність декількох ферментів одночасно в складі біоселективного елементу значно ускладнює розробку біосенсора, а також може накладати суттєві обмеження на його характеристики і можливості практичного використання. Ключовим фактором для розробки мультиферментного біосенсора є ретельний вибір ферментної системи для запобігання небажаної чутливості до інших речовин або низької стабільності біосенсора. Таким чином, перед розробкою нових мультиферментних біосенсорів потрібно зважити можливі позитивні і негативні наслідки такого підходу.

Відповідно дуже важливим, необхідним та актуальним є розробка нових та вдосконалення існуючих підходів використання мультиферментних систем при розробці електрохімічних біосенсорів. Тому головною метою даної дисертаційної роботи було розробити фундаментальні основи створення мультиферментних електрохімічних біосенсорів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Матеріали

В роботі для створення біоселективних мембран біосенсорів використовувалися ферменти:

глюкозооксидаза (ГОД) з *Penicillium vitale* (КФ 1.1.3.4) активністю 130 од. акт./мг фірми «Діагностикум» (Львів, Україна);

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.) з 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);

ГОД із *Aspergillus niger* (КФ 1.1.3.4) з активністю 272 од. акт./мг фірми «Genzyme» (Великобританія);

гексокіназа (ГК) із *Saccharomyces cerevisiae* (КФ 2.7.1.1) з активністю 30,6 од. акт./мг була фірми «Sigma-Aldrich» (США);

аргіназа з печінки бика (КФ 3.5.3.1) з активністю 105 од. акт./мг була 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 була фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (Німеччина);

α -глюкозидаза з *Bacillus stearothermophilus* (КФ 3.2.1.20) активністю 109 од.акт./мг була фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (Німеччина);

α -глюкозидаза з пекарських дріжджів (КФ 3.2.1.20) активністю 5,7 од.акт./мг була фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (Німеччина);

ацетилхолінестераза (АЦХЕ) із електричного вугря (КФ 3.1.1.7) активністю 426 од.акт./мг була 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 були фірми «Fluka» (Німеччина);

апіраза з картоплі (КФ 3.6.1.5) активність 7,7 од.акт./мг виробництва 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 глутарового альдегіду (ГА), мета- орто- та пара- фенілендіамін та (1,5 ваг. %) розчину рутеній (III) нітрозил нітрату $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NO}_3)_x(\text{OH})_y, (x + y = 3)]$ були виробництва «Sigma–Aldrich Chemie» (Франція та Німеччина); PVA-SbQ фірми «Тоуо Gosei Kogyo Co. Ltd» (Японія), DEAE-Dextran фірми «Fluka Biochemica» (Франція); лактітол виробництва «Fluka» (Швейцарія).

Використані в роботі субстрати та інтерференти: 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), гуанозина-5'-

трифосфат (ГТФ) и урацил-5'-трифосфат (УТФ), гомованілінова, аскорбінова, аспарканова, сечова кислоти, водний розчин перекису водню (3 ваг. %), цистеїн, глютамін, дофамін, ацетамінофен (парацетамол), аденозин та формальдегід виробництва «Sigma–Aldrich Chemie» (Франція та Німеччина).

Кофактори ферментів, що використовувались в роботі, тіамінпірофосфат (ТПФ) фірми «Biopharma» (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 буфера: ТРІС $(HOCH_2)_3CNH_2$, рН 8,1; HEPES, 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 обирали (від 2,5 до 100 мМ) в залежності від методики вимірювання (амперометрія чи кондуктометрія) та характеристик відповідного біосенсора.

В якості розчинників використовували: ацетонітрил, диметилсульфоксид (ДМСО), метанол, етанол (чистота 99,8%, фірми «Sigma–Aldrich Chemie» GmbH, Німеччина).

Як інгібітори ферментів використовували модельні розчини іонів важких металів: $Pb(NO_3)_2$, $Cu(NO_3)_2$, $Co(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2$, $Hg(NO_3)_2$, $AgNO_3$, $Sr(NO_3)_2$ («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).

В роботі використовувались силікаліти, які були синтезовані в Центрально-східному технічному університеті Анкари (Туреччина). Методики їх синтезу описані в роботі [181].

Усі інші неорганічні сполуки, що використовували в роботі, були отримані від вітчизняних виробників та мали ступінь чистоти «ч.д.а.» та «х.ч.».

2.2. Конструкції сенсорних перетворювачів

2.2.1. Кондуктометричні перетворювачі

Найкращим перетворювачем для виготовлення кондуктометричних біосенсорів є перетворювач на основі гребінчастих тонко плівчастих електродів. Кондуктометричний перетворювач - це мініатюрний чіп на основі двох пар гребінчастих електродів з металу, що використовується для вимірювань зміни провідності шару розчину в безпосередній близькості до робочої поверхні електродів.

При створенні кондуктометричних перетворювачів в якості матеріалу для виготовлення використовуються благородні метали, а для підкладки - непровідні матеріали, а саме скло або кераміка. Матеріал підкладки, як правило, не впливає на чутливість кондуктометричного перетворювача. Кондуктометричні електроди найчастіше виготовляються фотолітографічним способом після термовакуумного напилення шару золота на підкладку із ситалу.

В роботі використовувались перетворювачі, виготовлені по нашим рекомендаціям в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова (м. Київ, Україна). Сенсор представляє собою ситалову підкладку розміром 30 мм × 5 мм, на яку шляхом фотолітографії та вакуумного напилення нанесені електроди із золота (рис. 2.1). В якості підшару, для покращення адгезії використовували хром товщиною 0,1 мкм. Кожен з таких перетворювачів

складається із 20 пар растрових електродів, з шириною та відстанню між ними 20 мкм, та загальною площею чутливої поверхні в межах 2 мм².

В частині роботи, що стосувалась розробки методики тестування кондуктометричних перетворювачів, поряд із золотими електродами, використовували також кондуктометричні перетворювачі на основі платини.

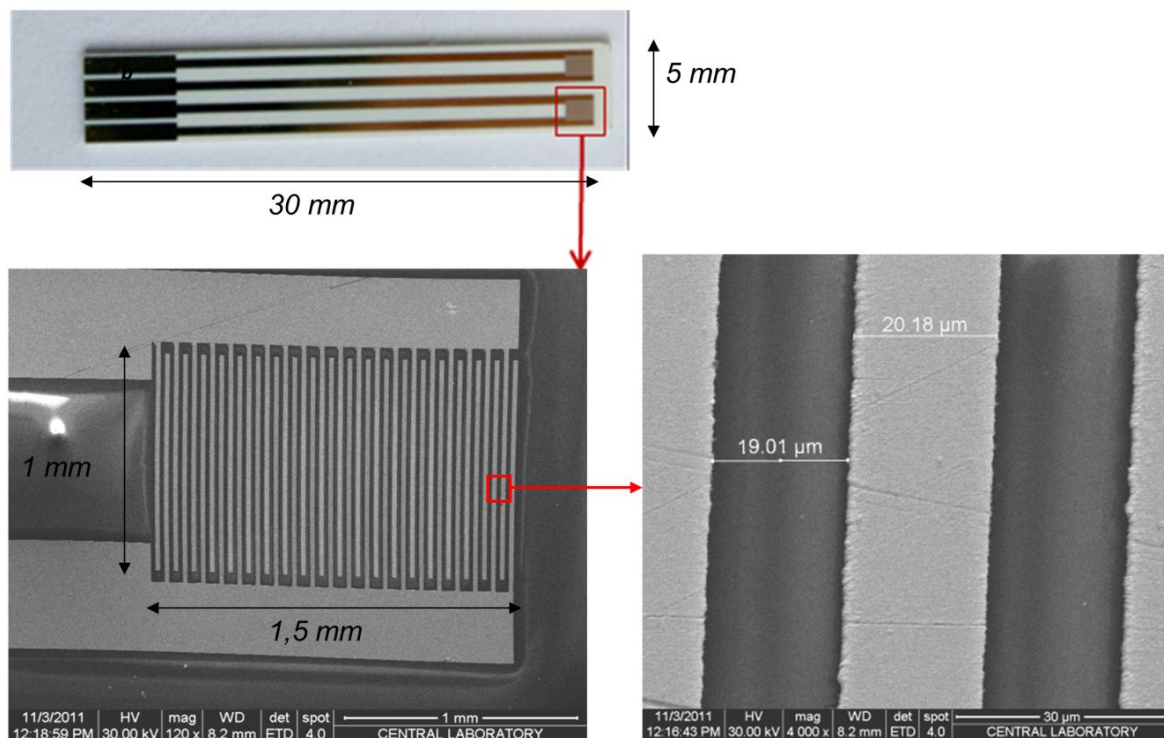


Рис. 2.1. Зовнішній вигляд кондуктометричних перетворювачів з диференційною парою золотих гребінчастих електродів, нанесених на ситалову основу.

2.2.2. Амперометричні перетворювачі на основі дискових платинових електродів

В основі роботи амперометричного методу аналізу, а саме амперометричного біосенсора, лежить визначення сили струму що протікає в

електрохімічній комірці при прикладеному постійному потенціалі, за наявності в розчині електроактивних речовин. В якості амперометричних перетворювачів, в роботі використовували датчики на основі платинових дискових електродів, що виготовлялись в нашій лабораторії (рис. 2.2).

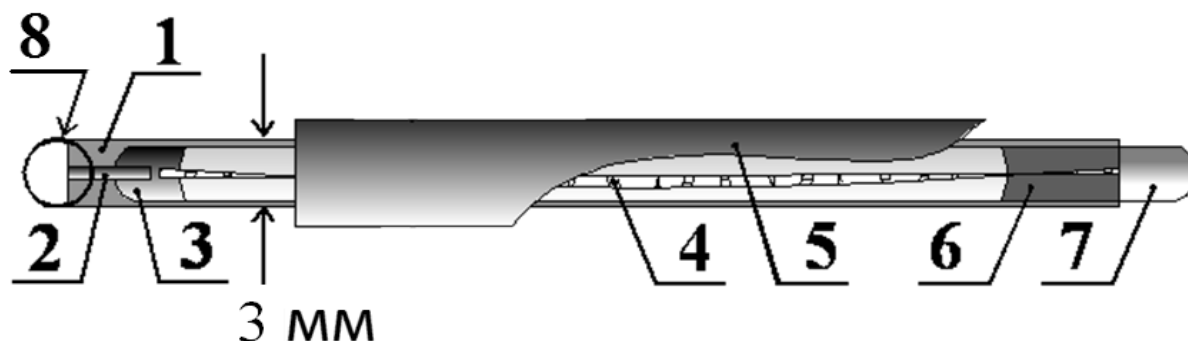


Рис. 2.2. Схематична будова амперометричного перетворювача на основі дискового електроду із платини: 1) скляна трубка; 2) платиновий дріт; 3) сплав Вуда; 4) срібний дріт; 5) захисне покриття; 6) епоксидна смола; 7) контактна зона; 8) чутлива ділянка перетворювача.

Для виготовлення платинових дискових електродів, платиновий дріт і довжиною 3 мм та діаметром 0,4 мм, запаювали у кінцевій частині скляного капіляра діаметром 3,5 мм. Протилежний кінець дроту виконував роль робочої поверхні перетворювача. Після цього платиновий дріт за допомогою сплаву Вуда приєднували до срібного провідника, що знаходився всередині скляного капіляра. З іншого кінця провідника приєднували мідну контактну ділянку для підключення до робочої установки. На останньому етапі, поверхню електродів шліфували із використанням порошку оксиду алюмінію (розмір частинок 0,1 мкм та 0,05 мкм), а безпосередньо перед іммобілізацією біоселективного елементу, протирали її етиловим спиртом. Періодично проводили оновлення електродної поверхні шляхом описаного шліфування. Тобто, один перетворювач використовувався багаторазово для послідовного виготовлення декількох різних біосенсорів.

2.2.3. Мікроелектрод циліндричного типу на основі вуглецевого волокна

Мікроелектроди (рис. 2.3.) на основі вуглецевого волокна ($D = 30$ мкм, тип AVCO, Lowell, MA) були, також, виготовлені в нашій лабораторії. Для цього, скляний капіляр з відтягнутим кінцем обрізали таким чином, щоб отримати тупий зріз з внутрішнім діаметром приблизно 35 мкм. Всередину нього вставляли вуглецеве моноволокно довжиною 8-10 мм, та діаметром 30 мкм. Місця з'єднання капіляра з вуглецевим волокном ретельно запаювали. Після цього вільний кінець вуглецевого волокна обрізали за допомогою скальпеля під мікроскопом до необхідної довжини (500 мкм). Якісний електричний контакт між вуглецевим волокном та срібним провідником забезпечував затискний контакт. Після цього всередині скляного капіляра, срібний провідник припаювали до мідного, який, в свою чергу, під'єднували до потенціостату.

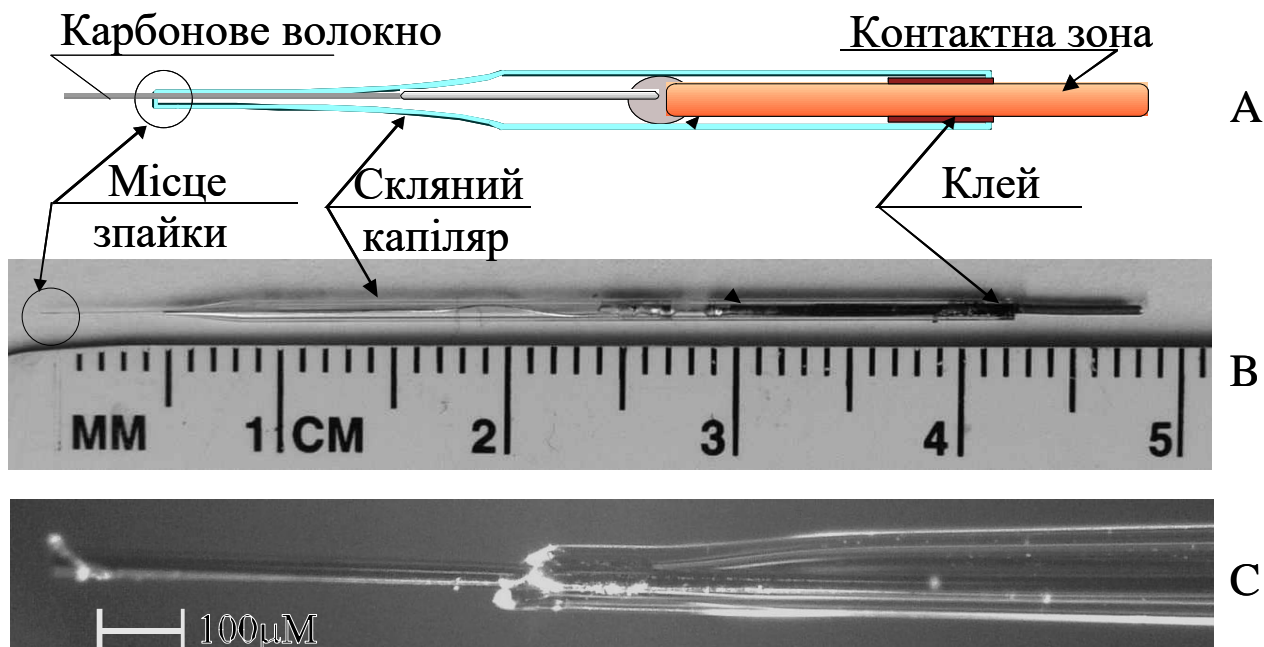


Рис. 2.3. Конструкція амперометричного мікроелектрода на основі вуглецевого волокна. Схематичний (А) та зовнішній (В, С) вигляд перетворювача.

2.2.4. Циліндричний мікроелектрод на основі платиного дроту

Мікроелектроди на основі платиного дроту ($D = 25 \text{ мкм}$) виготовляли в нашій лабораторії (рис. 2.4).

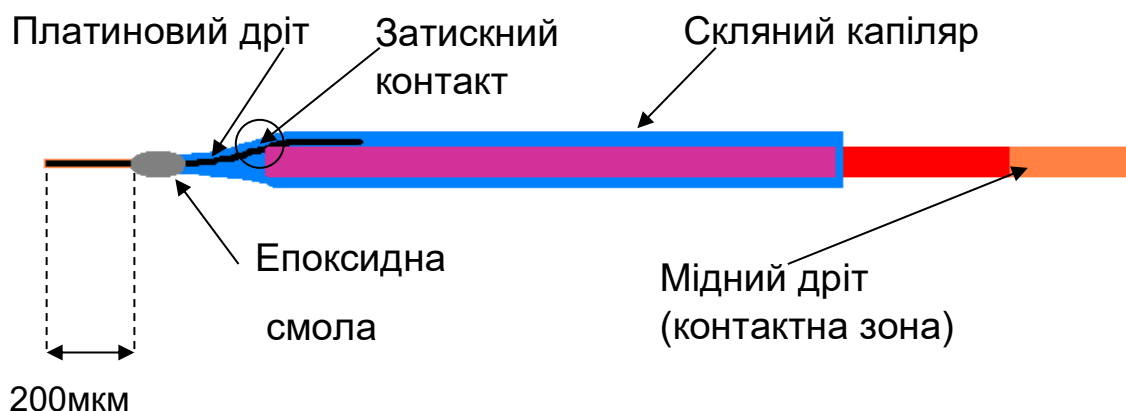


Рис. 2.4. Схематичний вигляд конструкції амперометричного мікроперетворювача на основі циліндричного платиного електроду.

Скляний капіляр виготовляли згідно описаної вище методики (розділ 2.2.3). В середину нього вставляли платиновий дріт 4-6 мм. Місця з'єднання капіляра з платиновим дротом, герметизували за допомогою епоксидної смоли. Кінець платиного дроту обрізали до довжини 100-200 мкм за допомогою скальпеля під мікроскопом. Електричний контакт між обома провідниками забезпечувався через затискний контакт. Інший край мідного дроту слугував контактною зоною для підключення до потенціостату.

2.3. Модифікація перетворювачів

2.3.1. Методика металізації амперометричних мікроелектродів на основі вуглецевого волокна

Експерименти з електрохімічним нанесенням рутенію виконували в комірці об'ємом 1 мл. Розчин для металізації отримували додаванням відомої кількості (1,5 ваг. %) розчину рутеній (III) нітрозил нітрату $[\text{Ru}(\text{NO})(\text{NO}_3)_x(\text{OH})_y, (x + y = 3)]$ до буферного розчину (рН 7,4) у об'ємному співвідношенні 50/50. Впродовж цієї процедури рН знижувалось приблизно до значення 1-2. Кінцеве значення рН (близько 4,5) забезпечували додаванням КОН. Електрохімічне нанесення рутенію з розчину виконували шляхом використання необхідного постійного потенціалу протягом 30 хвилин (відносно Ag/AgCl електрода порівняння). Після нанесення, модифікований електрод ретельно промивали у 10 мМ фосфатному буферному розчині (рН 7,4).

2.3.2. Методика нанесення додаткової полімерної мембрани на амперометричні перетворювачі

Методика модернізації мікроелектродів на основі платинового дроту була ідентична з методикою модернізації мікроелектродів на основі вуглецевого волокна. Для покращення селективності перетворювачів відносно електроактивних речовин на їх чутливі ділянки було нанесено шар полімеру полі-мета-фенілендіаміну. Нанесення додаткової мембрани проводили в розчині 0,1 М мономеру мета-фенілендіаміну у 10 мМ фосфатному буферному розчині (рН 7,0). Перед використанням розчин мета-фенілендіаміну обезкиснювали шляхом 15-хвилинного продування аргоном.

Електрохімічне осадження плівки на поверхні платиного дроту здійснювали на протязі 45 хвилин при постійному робочому потенціалі (+0,7 В). Перед нанесенням біоселективної мембрани модифіковану поверхню перетворювача ретельно промивали дистильованою водою.

2.3.3. Методика модифікації поверхні перетворювачів шаром цеоліту

Для модифікації перетворювачів шаром цеолітів, спочатку готували їхні розчини. Наважки цеолітів розчиняли в 5 мМ калій-фосфатному буфері, рН 7,4, кінцева концентрація яких складала від 0,5 до 10 % (ваг. %). З метою отримання гомогенних сумішей, отримані суспензії обробляли ультразвуком на водяній бані впродовж двох годин. Після цього суспензії цеолітів наносили на чутливі ділянки електрохімічних перетворювачів (об'ємом 0,2 мкл на кожну), та залишали у сухо-жаровій шафі на 5 – 25 хв., при температурі 100 – 130°C (амперометричні перетворювачі), або 170 – 200°C (кондуктометричні перетворювачі), для міцної фіксації частинок на поверхні перетворювача. Після цього, датчики витримували при кімнатній температурі близько 10 хв, та відмивали робочим буферним розчином від незв'язаних частинок цеолітів. Як результат - на робочих областях перетворювачів формувалася шар мікрочастинок.

2.3.4. Методика модифікації біосенсорів додатковою мембраною на основі Нафіон/поліуретан

Зовнішня напівпроникна додаткова мембрана наносилась поверх біоселективного елемента. Для покриття використовувалась суміш Нафіон-поліуретан в етанол-тетрагідрофурані (концентрація кожного компоненту складала 1 %, ваг. %). Перетворювачі з біоселективною мембраною

поспідовно були занурені п'ять разів у краплю розчину Нафіон-поліуретан з затримкою 1 хв між кожним зануренням. Біосенсори з нанесеною додатковою мембраною зберігали при кімнатній температурі протягом 15 хвилин. Перед використанням, біосенсори промивали 3 рази по 3 хвилини у робочому буферному розчині, для вимивання незв'язаних компонентів.

2.4. Виготовлення біоселективних елементів

2.4.1. Адсорбція ферментів на цеоліті

Однією з методик іммобілізації, використаних в роботі, була адсорбція ферменту на кондуктометричному перетворювачі, вкритому шаром цеоліту [182]. Для формування ферментної мембрани, на одну з пари електродів наносили 0,15 мкл суміші на основі 5% ферменту, 5% БСА та 10% гліцеролу в 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, а на іншу (референтну) пару електродів перетворювача наносили 0,15 мкл суміші на основі 10 % БСА у такому ж буферному розчині. Після цього, перетворювач залишали на повітрі при кімнатній температурі, до повного висихання електродів (20 хв).

2.4.2. Іммобілізація ферменту в БСА мембрану в насичених парах глутарового альдегіду

Іншою методикою, що використовувалась в експериментах, була іммобілізація ферменту в БСА мембрану в насичених парах глутарового альдегіду [183]. Для виготовлення робочих біоселективних мембран на основі ферменту використовували розчин з вмістом: 5% ферменту, 5% БСА та 10% гліцеролу у 20 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4. Суміш для виготовлення референтної мембрани готували так само, але замість ферменту

використовували тільки БСА, кінцева концентрація якого складала 10% (еквівалентна кількості білку в мембрані). Дані розчини за допомогою мікропіпетки наносили на робочі ділянки перетворювача до повного покриття робочої поверхні електродів. Перетворювачі з нанесеними мембранами інкубували в насичених парах глутарового альдегіду (ГА) протягом 25 хвилин. Потім мембрани висушували 5-10 хвилин на повітрі при кімнатній температурі. Потім, біосенсиори відмивали в робочому буферному розчині від надлишку незв'язаного ГА та інших компонентів мембран.

2.4.3. Імобілізація ферменту в БСА мембрану в краплі глутарового альдегіду

Для виготовлення робочих мембран за допомогою імобілізації в краплі ГА використовували розчин: 10 % ферменту та 10 % БСА у 20 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4, з 20 % гліцеролом[184]. Суміш референтної мембрани була такою ж самою, але замість ферменту містила лише БСА (20 %). Перед нанесенням, розчини для референтної та робочої мембран змішували з 2 % водним розчином ГА у пропорції 1:1. Безпосередньо після цього, ці суміші наносили на поверхні кондуктометричних гребінчастих електродів (0,15 мкл на кожен пару) та залишали для висихання протягом 45 хв за кімнатної температури. Після цього, біосенсиори занурювали у робочий буферний розчин для вимивання незв'язаного ГА та інших компонентів біоселективного елементу.

2.4.4. Імобілізація ферменту на нітроцелюлозі

В дослідженні застосовували методику імобілізації ферменту на нітроцелюлозі, що розроблена та детально описана в роботі [185]. Єдиною

відмінністю методики від першоджерела було використання 1 %-го розчину нітроцелюлози, а не 5 %-го, оскільки в останньому випадку чутливість використаного в роботі кондуктометричного перетворювача значно знижувалась. Після модифікації поверхні перетворювача нітроцелюлозою на одну з пар електродів наносили 0,15 мкл 5 % розчину ферменту з 5% БСА та 10% гліцерину в 20 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5, на іншу пару електродів (референтну) – 0,15 мкл 10 % розчину БСА в 20 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. Далі, біосенсори висушували за кімнатної температури та відмивали буферним розчином від незв'язаного ферменту.

2.4.5. Фотополімеризація ферменту в PVA/SbQ

Наступною методикою іммобілізації, яку використовували в роботі, була фотополімеризація ферменту в PVA/SbQ [186]. Для формування біоселективної мембрани на одну з пар електродів наносили 0,3 мкл суміші, яка містила 2,5 % ферменту з 2,5% БСА, 25 % PVA/SbQ та 10 % гліцерину в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5, на іншу пару електродів (референтну) наносили 0,3 мкл такого ж розчину з 5 % БСА, після чого перетворювач з нанесеними мембранами опромінювали ультрафіолетом протягом 30 хв. за допомогою ультрафіолетової лампи KF-4М. Після формування мембран перетворювачі відмивали від незв'язаних компонентів.

2.5. Синтез та дослідження властивостей силікалітів

2.5.1. Синтез силікаліту з розміром кристалів 450 нм

Вихідний гель для синтезу силікалітів наступні речовини у таких молярних співвідношеннях: ТРАОН : 5 TEOS : 500 H₂O.

Тетраетилортосилікат (TEOS) слугував джерелом кремнію, тетрапропіламмонію гідрохлорид (ТРАОН) слугував шаблоном. Дану суміш перемішували за кімнатної температури протягом 6 годин, після чого залишали в термостаті на 18 годин при 125 °С. Отримані частинки центрифугували (13000 об./хв.), відмивали деіонізованою водою та висушували при 80 °С. Морфологію отриманого силікаліту можна побачити на рис. 2.5.

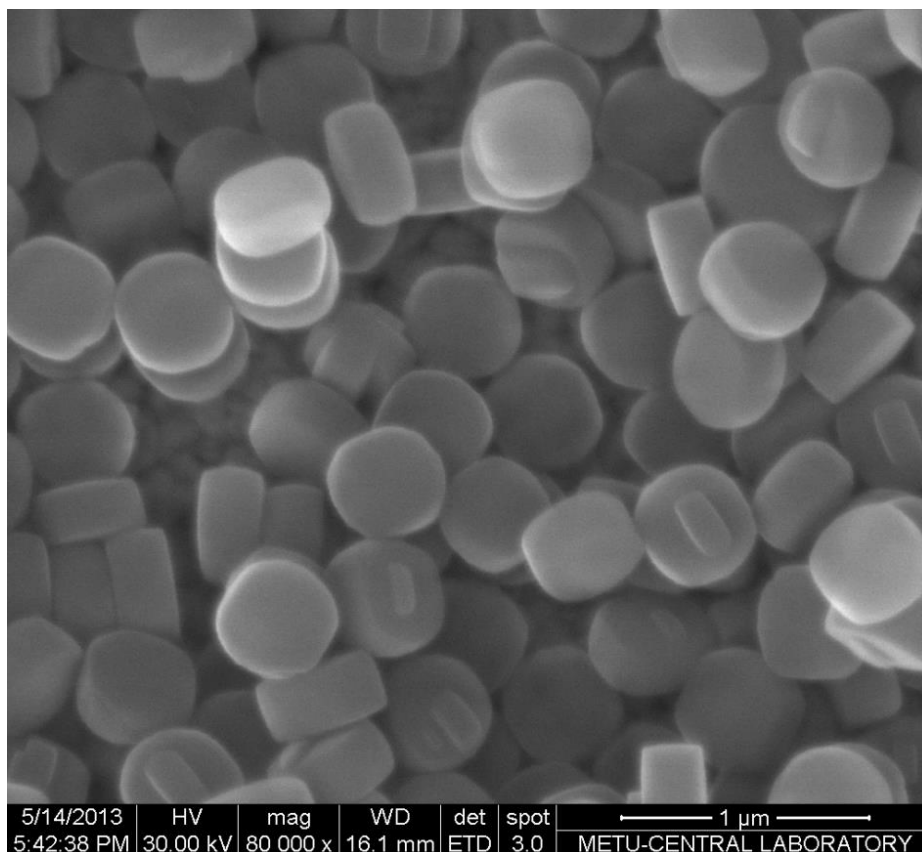


Рис. 2.5. Фотографія частинок силікаліту (450 нм) отримана за допомогою скануючого електронного мікроскопу.

2.5.2. Синтез силікаліту з розміром кристалів 160 нм

Вихідний гель, для синтезу силікаліту, містив наступні речовини у таких молярних співвідношеннях: 4ТРАОН: 25 SiO₂: 480 H₂O:100EtOH. Після

гідролізу TEOS за допомогою розчину ТРАОН та перемішування за кімнатної температури впродовж 1 доби, отримували чистий гомогенний розчин. Кристалізацію розчину проводили при температурі 98 °С протягом 20 годин. Після цього, силікаліт відділяли від непрореагувавших компонентів шляхом центрифугування. Потім, отримані зразки були кальциновані на повітрі при температурі 600 °С протягом 10 годин. Кінцевий продукт отримували після обробки кристалів в ультразвуковій бані з етиловим спиртом висушування при кімнатній температурі.

2.5.3. Синтез силікаліту з розміром кристалів 80 нм

Для синтезу силікаліту, використовувався гель, що, містив вихідні речовини у таких молярних співвідношеннях: 9ТРАОН:25SiO₂:408H₂O:100EtOH. Розчин для синтезу отримували шляхом використання TEOS, ТРАОН та деіонізованої води і витримували 1 добу при кімнатній температурі. Кристалізацію розчину проводили при 90 °С протягом 20 годин. Чистий силікаліт отримували після центрифугування з деіонізованою водою (20000 об./хв), після чого, продукт був кальцинований на повітрі при температурі 600 °С протягом 10 годин.

2.5.4. Характеризація частинок силікалітів

Розмір та морфологію частинок досліджували за допомогою скануючого мікроскопу FEI QUANTA 400 F. Чистоту отриманих зразків, а також, властивості кристалів визначали за допомогою використання дифракції рентгенівських променів на порошку (XRD). На рис. 2.6. приведено типову діаграму для силікаліту.

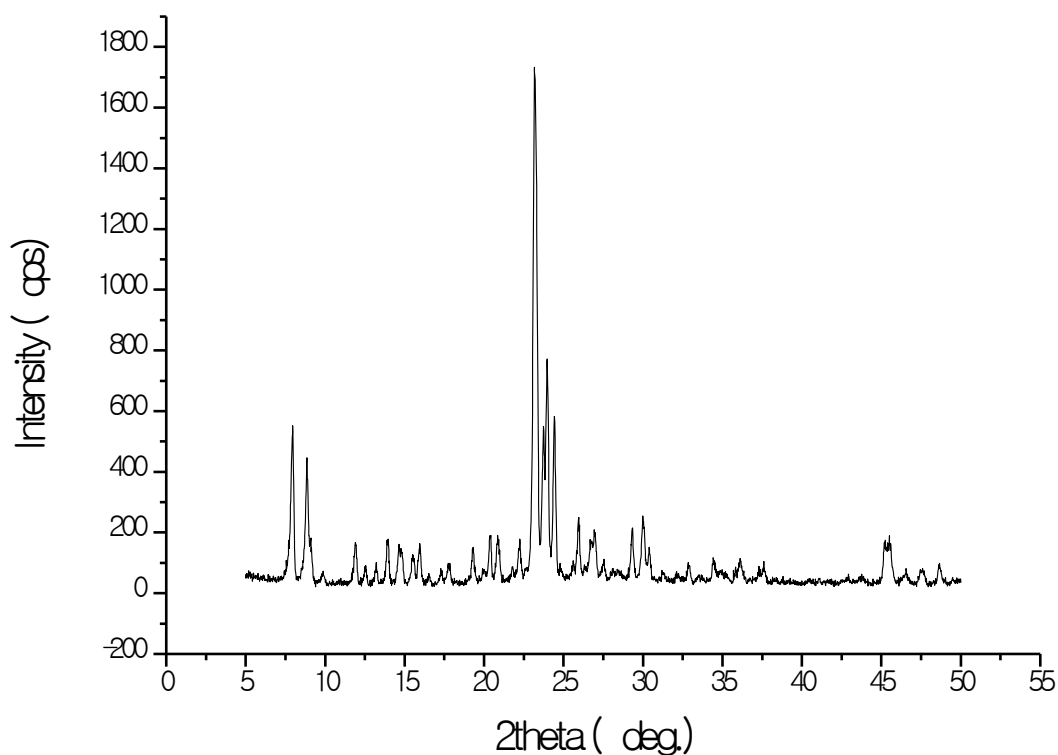


Рис. 2.6. XRD діаграми синтезованого силікаліту.

Характеристики частинок силікаліту, використаних в даній роботі, наведені в табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Характеристики частинок силікалітів різного розміру

Мікрочастинка	Розмір частинок (мкм)*	Площа поверхні (м ² /г)**	Об'єм пор (сс/г)***	Діаметр пор (Å)***
силікаліт (450 нм)	0,45	281,7	2,014	5,221
силікаліт (160 нм)	0,16	502,4	0,2076	13,5
силікаліт (80 нм)	0,08	331,9	0,1373	9,5

Примітки: 1 – «*» - скануючий мікроскоп FEI QUANTA 400F ; 2 – «**» - багатоточкова BET (Multipoint BET); 3 – «***» - аналізатор Quantachrome Corporation Autosorb-6.

2.6. Вимірювальні прилади та експериментальні схеми

2.6.1. Схема експериментальної стаціонарної установки для кондуктометричних вимірювань

Для проведення вимірювань змін провідності в приелектродному шарі кондуктометричного перетворювача використовували вимірювальну установку для кондуктометричних вимірювань (рис. 2.7).

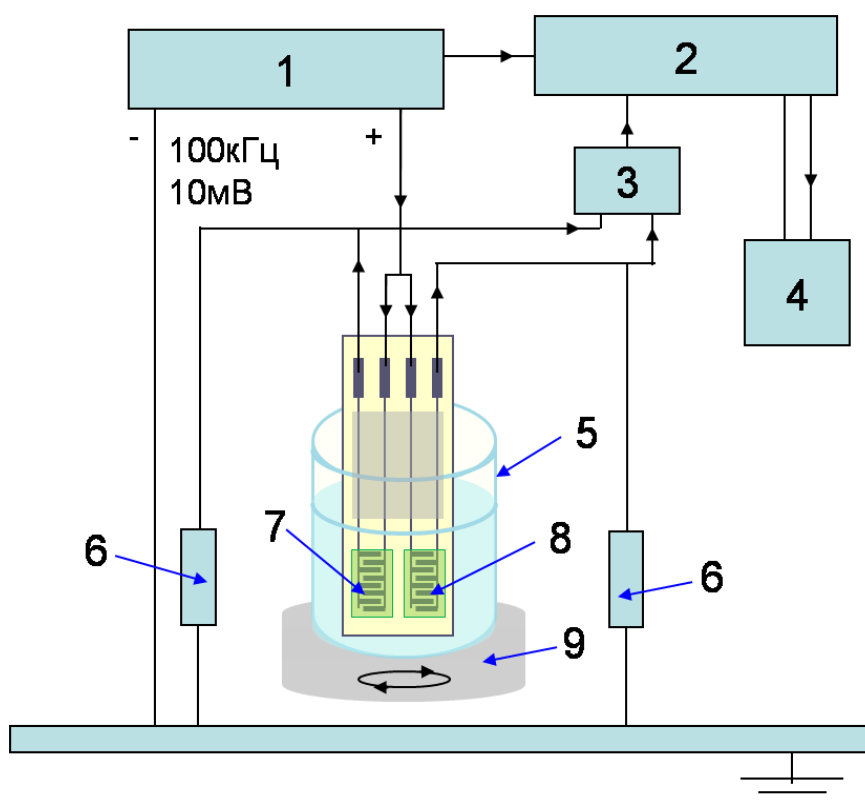


Рис. 2.7. Схема вимірювальної установки: 1 – генератор сигналів, 2 – нановольтметр, 3 – диференційний підсилювач, 4 – реєструючий пристрій, 5 – вимірювальна комірка з буферним розчином (2 мл), 6 – опори навантаження, 7, 8 – електроди з нанесеними на них ферментною та референтною мембранами, 9 – магнітний перемішувач.

З генератора сигналів ГЗ-118 змінна напруга з амплітудою 10 мВ та частотою 100 кГц подається на дві пари гребінчастих електродів кондуктометричного перетворювача. Диференційний режим вимірювань застосовувався для підвищення чутливості сенсорів та зменшення шумів, що можуть продукуватись неспецифічними впливами. Під час роботи, електроди знаходяться у вимірювальній комірці з досліджуваним розчином.

Отриманий на електродах сигнал з опорів навантаження $R_n = 1$ кОм надходить через диференційний підсилювач «Unipan-233-6» на селективний нановольтметр «Unipan-233», з якого сигнал подається безпосередньо на реєструючий пристрій (самописець або персональний комп'ютер).

2.6.2. Схема експериментальної установки на основі портативного аналізатора «МСП-3»

На рис. 2.8 представлено схему портативної експериментальної кондуктометричної установки для проведення вимірів з біосенсорами. Зліва приведено схематичний вигляд біосенсора: на одну пару електродів (1) наносили робочу мембрану на основі ферментів, а на іншу (2) наносили референтну мембрану на основі БСА (4). Портативний кондуктометр «МСП-3» (5) був розроблений та виготовлений в Інституті електродинаміки НАН України [187]. Кондуктометрична схема включала в себе тримач для біосенсора (6) і штатив (7). Для проведення вимірювань на основу штативу встановлювали робочу комірку (8) що містила досліджуваний розчин (9), а увесь сенсорний блок розміщали на магнітному перемішуючому пристрої (10). Вимірювальний прилад «МСП-3» під'єднували до електромережі через адаптер (11), до біосенсору - через контакт за рахунок сполучних дротів (12), а до робочого комп'ютера (13) зі встановленим пакетом необхідного

програмного забезпечення - через контакт (14). Для проведення вимірювань використовували частоту струму 37 кГц та амплітуду 14 мВ.

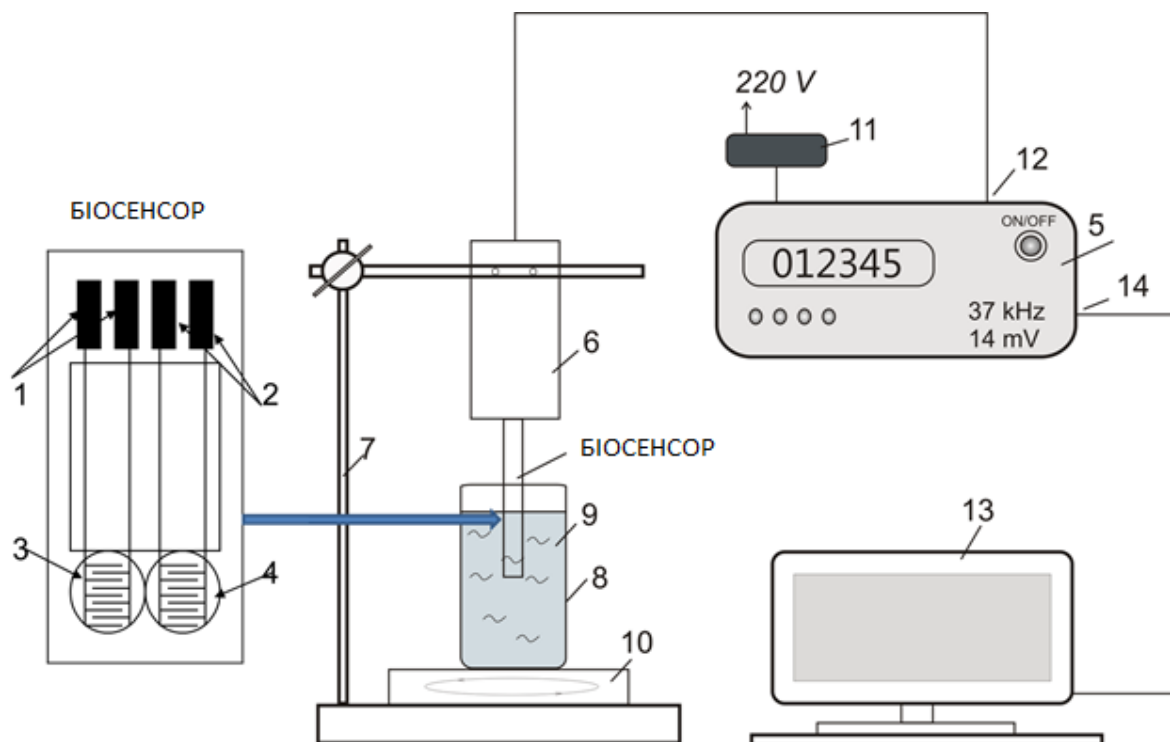


Рис. 2.8. Схема кондуктометричної установки на основі портативного аналізатора «MCP-3».

2.6.3. Метод імпедансної спектроскопії

Для вимірювань використовували прилад VoltaLab® 40 (PGZ 301) з пакетом програмного забезпечення VoltaMaster4 (Radiometer Analytical, Франція). Кондуктометричний перетворювач (КП) підключали до вимірювальної системи і занурювали у робочу комірку, в якій постійно відбувалось перемішування розчину за допомогою магнітної мішалки.

Вимірювання проводили при напрузі 10 мВ в діапазоні частот змінного струму від 1 Гц до 100 кГц. Отримані сигнали оцінювали по відрітку кривої імпедансного спектру, що проектується на вісь абсцис, активний опір Z_{real} . При проведенні вимірювань були отримані імпедансні спектри при додаванні

розчину хлориду калію для КП, виготовлених на основі електродів з низки металів. Оцінювали частотні залежності реальної складової адмітансу від концентрацій розчину хлориду калію. В цьому випадку першу пару електродів умовно приймали за праву, і позначали «R», а другу – за ліву, позначаючи її «L».

2.6.4. Вимірювальна установка для амперометричних досліджень

Для проведення амперометричного аналізу, в роботі використовували трьохелектродну схему: робочі електроди, допоміжний платиновий електрод та електрод порівняння (Ag/AgCl) підключали до потенціостату PalmSens (Нідерланди) або аналогічний прилад вітчизняного виробництва. Даний восьми канальний пристрій (CH-8 multiplexer, Palm Instruments BV, Нідерланди), підключений до потенціостату, забезпечував отримання сигналів одночасно з 8-ми робочих електродів. Однак, зазвичай до нього були підключені лише 2-3 робочі електроди. Потенціостат вітчизняного виробництва не потребував мультиплексора, адже працював на 4-х каналах одночасно. Відстань між допоміжним та платиновим електродом, а також усіма робочими біосенсорами була однаковою в процесі вимірювання та складала близько 5 мм. Схема та загальний вигляд вимірювальної установки для амперометричних вимірювань показано на рис. 2.9 та 2.10, відповідно.

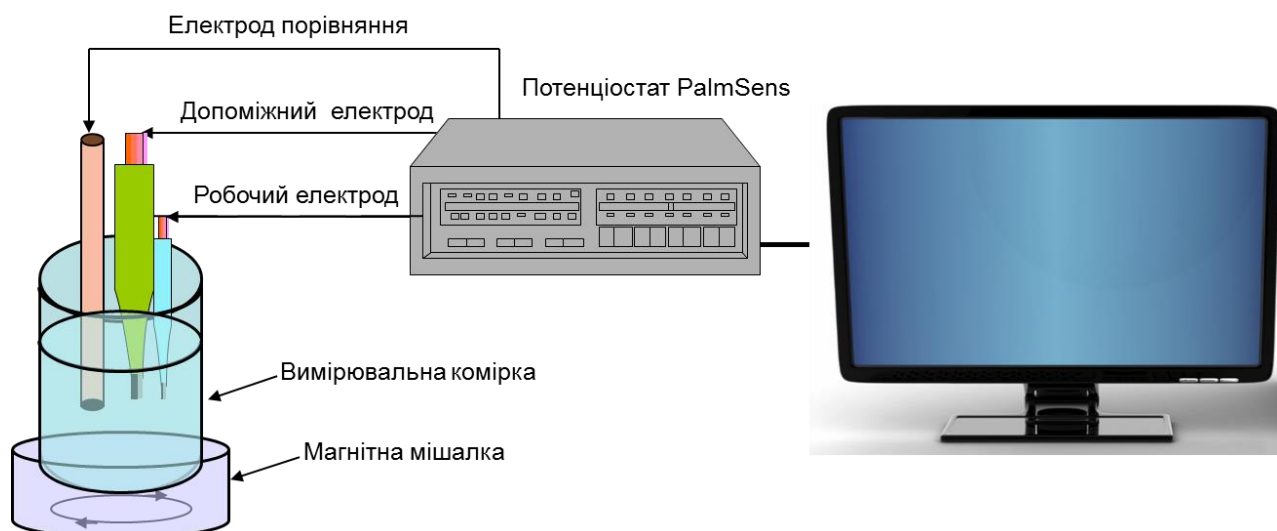


Рис. 2.9. Схема експериментальної установки для амперометричних вимірювань.



Рис. 2.10. Зовнішній вигляд вимірювальної установки для амперометричних вимірювань.

2.7. Методики вимірювання

Виміри проводили у 2,5-100 мМ фосфатному, TRIS та HEPES буферах, рН 6,5, 6,8, 7,4, 8,1 за кімнатної температури з використанням проточної та погрузної системи вимірювання. Для кожної системи буфер обирався в залежності від ферментів в складі біоселективного елементу біосенсора, типу перетворювача та можливих реальних зразків.

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

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

Усі роботи з біологічними рідинами проводили згідно правил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються при проведенні експериментів та для інших наукових цілей [191].

2.7.1. Прямий аналіз субстратів

Біосенсор розміщували у робочу комірку об'ємом 2-3,5 мл, заповнену буферним розчином. Після отримання стабільного початкового сигналу (базової лінії) в комірку додавали певну аліквоту вихідного розчину субстрату. Концентрацію субстратів змінювали додаванням до робочого буферу порцій стандартних концентрованих вихідних розчинів субстратів.

2.7.2. Методика проведення інгібіторного аналізу та процесу реактивації

Після стабілізації диференціального вихідного сигналу, невелику аліквоту концентрованого розчину субстрату додавали в вимірювальну комірку, після отримання відгуку на субстрат (A_0), біосенсор інкубують в розчині інгібітору протягом деякого часу, а потім відмивають від надлишку незв'язаного інгібітора та повторно вимірюють відгук на субстрат (A_1). Рівень інгібування (I_i) розраховується за формулою:

$$I_i = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100\% \quad (2.1)$$

Далі початкова активність біосенсора може бути відновлена лише після його інкубації протягом певного часу в розчині специфічного реактиватора, наприклад ЕДТА або цистеїну. В залежності від концентрації реактиватора та тривалості реактивації отримували відгук біосенсора (A_2) та рівень реактивації (I_r). Він розраховувався за тієюж формулою (2.1). Мірою концентрації реактиватора слугував рівень відновлення активності біосенсора ($I_{ва}$), що розраховувався за формулою:

$$I_{ва} = I_r - I_i \quad (2.2)$$

2.7.3. Методика біосенсорного вимірювання реальних зразків

Зазвичай вимірювання біосенсором реальних зразків проводилося за допомогою метода використання калібрувальної кривої та метода стандартних додавань (рис. 2.11).

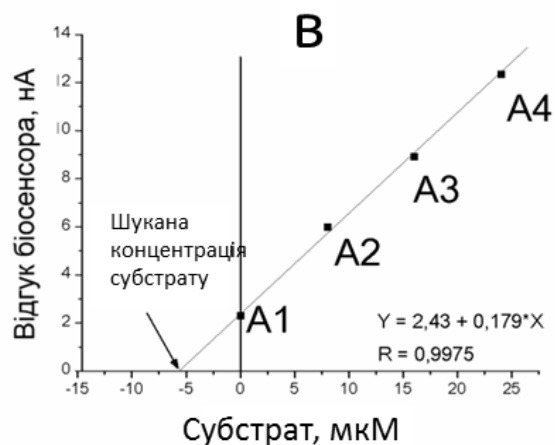
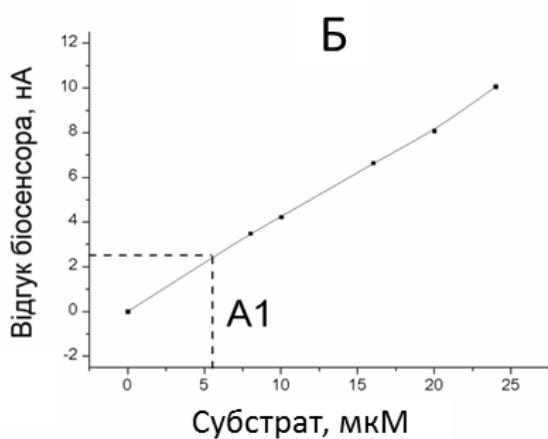
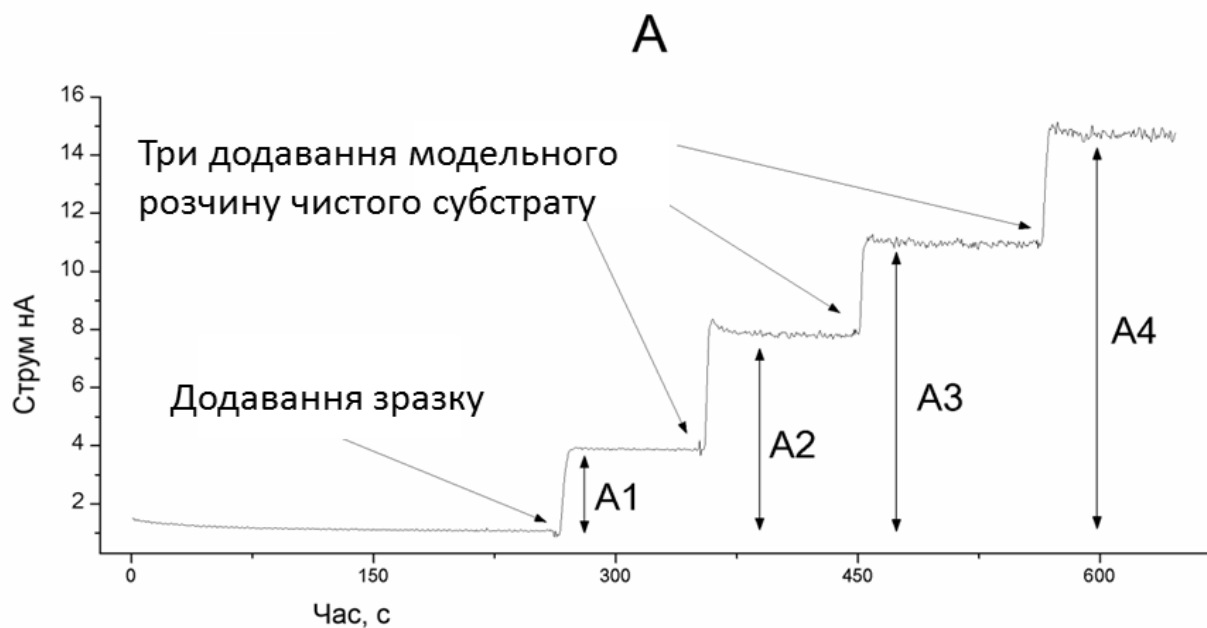


Рис. 2.11. А: відгуки біосенсора на додавання зразку (А1) та трьох послідовних додавань модельного розчину чистого субстрату (А2-А4). Б: калібрувальна крива для визначення даного субстрату. В: графік для визначення невідомої концентрації субстрату з використанням методу стандартних додавань.

У випадку використання калібрувальної кривої, концентрацію субстратів визначають шляхом порівняння відгуку біосенсора на додавання

зразка з отриманим калібрувальним графіком (рис. 2.11б). У разі стандартних додавань, було отримано відгуки біосенсора на додавання зразку і трьох наступних додавань модельного розчину чистого субстрату (рис. 2.11а). Далі, значення відгуків були побудовані, як показано на рис. 2.11в, і невідома концентрація субстрату в досліджувальному зразку була отримана на перетині прямої з віссю абсцис.

2.7.4. Методика вимірювання глутамату в культурі астроцитів

Культура астроцитів з кортексу була взята з мозку новонароджених щурів та культивована до стадії злиття окремих клітин (14 діб). Після того як культура досягала стадії злиття окремих клітин, астроцити були піддавалися впливу розчином арабінофуранозиду (концентрація 8 мкМ) з метою видалення залишків мікроглії.

Для моніторингу секреції глутамату астроцитами було застосовано мікробіосенсор, чутливий до L-глутамату. Для контролю селективності отриманого сигналу був застосований контрольний сенсор. 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 глутамату, та контрольним сенсором складала близько 100 мкм. Було застосовано механічну стимуляцію культури астроцитів [188] шляхом торкання поверхні клітин за допомогою кінця скляної мікропіпетки. Реєстрація сигналу проводилась з використанням потенціостату Ivinum PalmSens (PalmSens Corporation, Нідерланди).

2.7.5. Метод вимірювання сахарози з використанням високоефективної рідинної хроматографії

Метод ґрунтується на хроматографічному розділенні глюкози і сахарози на спеціальній колонці із модифікованою поверхнею нерухомої фази з подальшою реєстрацією коефіцієнта рефракції кожного компоненту за допомогою рефрактометричного детектора. Хроматографічний метод був використаний в роботі як порівняльний по відношенню до розробленого біосенсорного методу в хроматографічній лабораторії ТОВ «Сандора», (м. Київ). Використовували високоефективний рідинний хроматограф Agilent Technologies 1200 оснащений фотометричним діодно-матричним детектором UV-Vis G1315C, рефрактометричним детектором, проточним дегазатором G1322A, автосамплером G1329A, термостатом колонок G1316A в комплексі з персональним комп'ютером з програмним забезпеченням Agilent ChemStation. (Agilent Technologies, США). Використовували аналітичну колонку «Supelcogel H», довжиною 250 мм, внутрішнім діаметром 4,6 мм із захисною колонкою, довжиною 50 мм й аналогічними внутрішнім діаметром. Як рухому фазу використовували 0,0005 Н розчин H_3PO_4 . При цьому об'ємні витрати елюента становили 0,1 $\text{cm}^3/\text{хв}$.

2.7.6. Спектрофотометричне визначення глюкози, АТФ та КК

В якості контрольного методу визначення використовувався метод спектрофотометрії, адаптований з роботи [189]. Він базувався на визначенні пероксиду водню, який продукувався внаслідок ферментативної реакції окиснення глюкози ГОД.

Спектрофотометричні вимірювання проводились у разових пластикових кюветах з об'ємом 1 мл. Склад розчину в кюветі містив наступні

компоненти: 25 мМ HEPES буфер, рН 7,4, з 0,3 мМ натрієвої солі 3-(N-етил-3-метиланіліно)-2-гідроксипропансульфонової кислоти, 0,1 мМ 4-аміноантипірину, 1,8 од. акт. пероксидази хрону і аліквотою досліджуваного зразку. Запуск реакції відбувався після додавання до кювети ГОД та ГЕК. В процесі реакції, ГОД окиснювала глюкозу з утворенням пероксиду водню. Пероксидаза хрону в присутності пероксиду водню, шляхом окиснення натрієвої солі 3-(N-етил-3-метиланіліно)-2-гідроксипропансульфонової кислоти та 4-аміноантипірину утворювала забарвлений продукт. Інтенсивність забарвлення розчину була пропорційна концентрації пероксиду водню, а відтак, і концентрації глюкози (а також концентрації АТФ та активності КК). Реакція тривала 8 хв. (час інкубації підбирали попередньо; 8 хв – достатній час для досягнення максимального забарвлення розчину). Принцип визначення АТФ та КК спектрофотометрією був аналогічним до принципу роботи біосенсорної системи.

Інтенсивність поглинання світла розчином (абсорбцію) вивчали за допомогою спектрофотометра Thermo Electron Corporation Bio Mate 5. Довжина хвилі світла, яку використовували для проведення досліджень, складала 555 нм і була підібрана експериментальним шляхом – саме при ній спостерігався найбільший пік поглинання світла в продукту реакції. Перед додаванням ГОД та ГЕК визначали базову абсорбцію світла кожним розчином, яку згодом віднімали від значення абсорбції після реакції.

РОЗДІЛ 3

ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ПЕРЕТВОРЮВАЧІВ ТА ВИМІРЮВАЛЬНИХ СХЕМ

3.1. Вступ

Біосенсорика являє собою новітню галузь аналітичної біотехнології, одним з основних напрямів якої є розробка електрохімічних біосенсорів для виявлення та аналізу концентрацій низки речовин [190]. Найважливішими перевагами біосенсорів є їх висока чутливість та селективність, простота у використанні, швидкість аналізу, а також широкий діапазон речовин, що можуть бути визначені [192]. Однак ефективність роботи біосенсора залежить від характеристик фізичних перетворювачів та від функціональності вимірювальних портативних приладів, до яких підключено біосенсор. Тому перед початком розробки біосенсорів, по-перше, дуже важливо проводити вибір типу перетворювача, ретельне його тестування та оптимізацію основних робочих характеристик для більш ефективного використання цих перетворювачів при розробці біосенсорів. По друге, необхідно підібрати чи створити відповідний прилад та схему вимірювання в залежності від характеристик біосенсора та умов його подальшого функціонування.

Основною метою даної частини роботи було розробка методик обов'язкового тестування та оптимізації електрохімічних датчиків для подальшого їхнього використання в складі біосенсора. Запропонована методика має включати в себе проведення комплексного дослідження основних характеристик перетворювачів та вибір оптимальних умов для

їхнього функціонування. Також мають бути описано підходи щодо покращення початкових характеристик перетворювачів, таких як чутливість, стабільність, селективність відносно можливих інтерферуючих речовин, тощо.

Такі методики тестування датчиків дозволять швидко та якісно проводити оцінку придатності відповідних перетворювачів для розробки ферментних біосенсорів.

Інше завдання - підбір вимірювального приладу для роботи з розробленими біосенсорами. На даний час використовують потенціостати та кондуктометри лише закордонного походження – PalmSens [193], DropSens [194] та інші. Ціна таких приладів складає декілька тисяч доларів, що майже унеможлиблює їх придбання українськими лабораторіями. Окрім того, їх придбання є складним через низку бюрократичних процедур, оскільки представництв даних фірм в Україні немає, а замовляти їх напряму у виробника неможливо. Тому актуальною є розробка приладів вітчизняного виробництва, які б відповідали за характеристиками відомим приладам закордонного походження, але були б набагато вигіднішим в фінансовому плані, і вироблялись в Україні.

3.2. Оптимізація амперометричних перетворювачів

3.2.1. Вступ

Тестування амперометричних перетворювачів, які будуть використані для розробки біосенсорів, є важливою стадією, оскільки базові характеристики електрохімічних перетворювачів впливають на аналітичні характеристики біосенсорів на їх основі. Використання ж при розробці

біосенсорів перетворювачів з неприйнятними характеристиками унеможливило створення конкурентоспроможних біосенсорів.

3.2.2. Дослідження чутливості амперометричних перетворювачів за допомогою вольтамперометричних вимірювань

Перший етап запропонованої в роботі методики тестування амперометричних перетворювачів присвячений перевірці чутливості до пероксиду водню із використанням методу циклічної вольтамперометрії. Дослідження циклічних вольтамперограм, отриманих на амперометричних перетворювачах, дозволяє аналізувати їх чутливість до певних субстратів при різному робочому потенціалі. Окрім того, використання методу циклічної вольтамперометрії, дає змогу обирати оптимальний потенціал для подальшої роботи в амперометричному режимі.

Для амперометричних платинових дискових електродів було отримано вольтамперограми (діапазон потенціалів: 0 - +850 мВ, швидкість розгортання потенціалу 50 мВ/с) та проаналізовано чутливість в залежності від прикладеного потенціалу.

На рисунку 3.1 зображено приклад типових вольтамперограм, за допомогою яких аналізують чутливість амперометричних перетворювачів щодо перекису водню. Першу циклічну вольтамперограму було отримано на платиновому електроді у 25 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0 без субстрату (рис. 3.1, крива 1), другу – в тих самих умовах, але при наявності 100 мкМ пероксиду водню у вимірювальній комірці (рис. 3.1, крива 2). З рисунку видно що при додаванні у робочу комірку пероксиду водню з'являється окиснювальний струм та збільшення сигналу датчика.

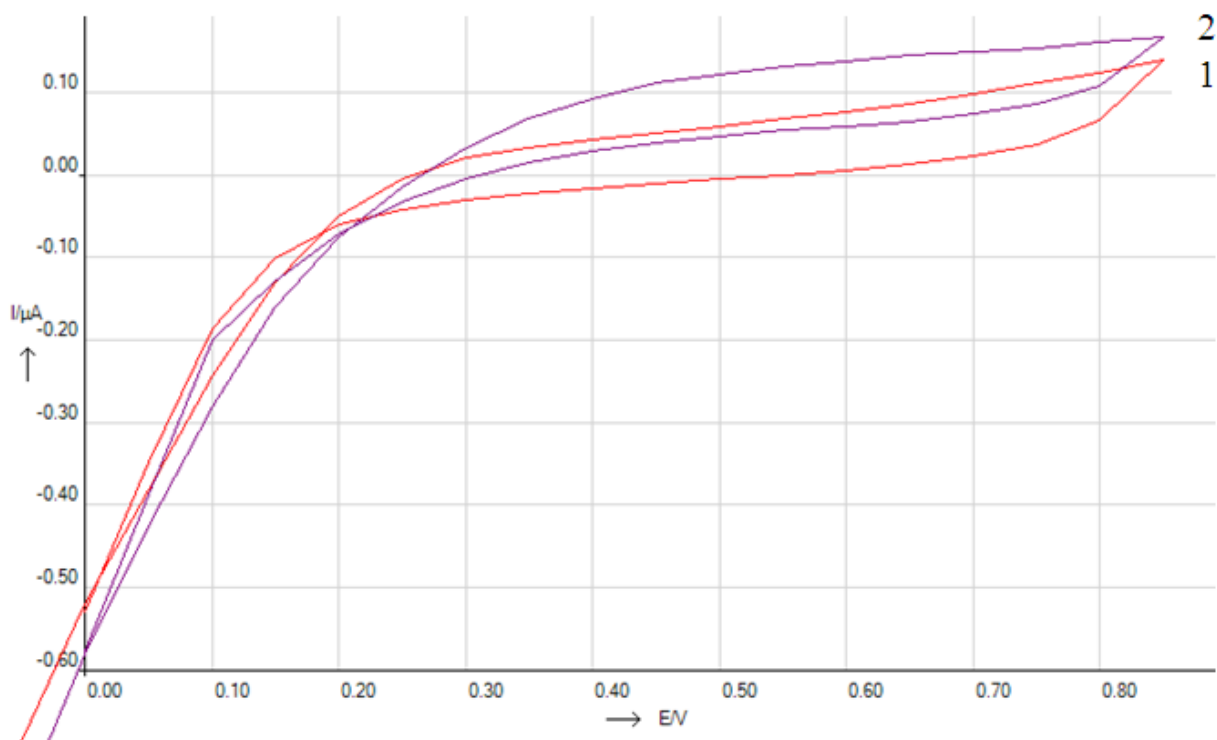


Рис. 3.1. Циклічні вольтамперограми, отримані на перетворювачах у 25 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0 (1) та за тих же умов при наявності 100 мкМ пероксиду водню у робочій комірці (2).

Залежність чутливості амперометричного платинового дискового електрода від величини прикладеного потенціалу визначали за допомогою методу циклічних вольтамперограм. На рис. 3.2 представлено результати проведеного дослідження, а саме залежність величини відгуків амперометричного перетворювача на додавання у вимірювальну комірку 100 мкМ пероксиду водню від прикладеного до нього потенціалу (0,3-0,85 В).

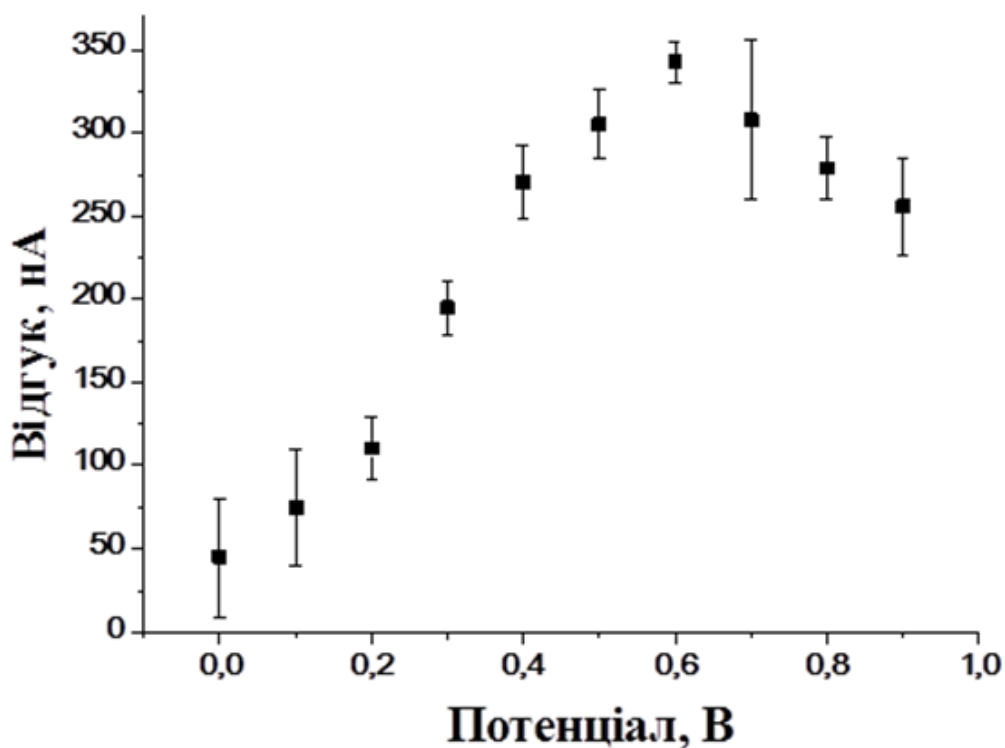


Рис. 3.2. Залежність величини відгуків амперометричного перетворювача на внесення у вимірювальну комірку 100 мкМ пероксиду водню від прикладеного потенціалу (0,3-0,85 В) відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Вимірювання проводили у 25 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0.

Аналізуючи отриману залежність, можна зробити висновок, що найбільша чутливість до пероксиду водню у досліджуваних амперометричних датчиків, спостерігається при робочому потенціалі в діапазоні від 0,5 до 0,6 В.

3.2.3. Дослідження відтворюваності сигналу амперометричних перетворювачів

Наступна стадія запропонованої методики, полягає у дослідженні відтворюваності сигналу амперометричних перетворювачів на основі

дискового платинового електроду. Дослідження проводили наступним чином: на протязі декількох годин з інтервалом 20 хвилин, отримували відгуки амперометричних перетворювачів на одну і ту ж саму концентрацію пероксиду водню (8 мкМ). Увесь час між вимірюваннями перетворювач залишався у робочому буферному розчині з постійним перемішуванням (рис. 3.3). Стандартне відхилення відгуків всіх перетворювачів було в межах $\pm 5\%$, що є цілком допустимим показником. Враховуючи це, проведення подальших процедур щодо вдосконалення відтворюваності перетворювачів даного типу є не обов'язковим.

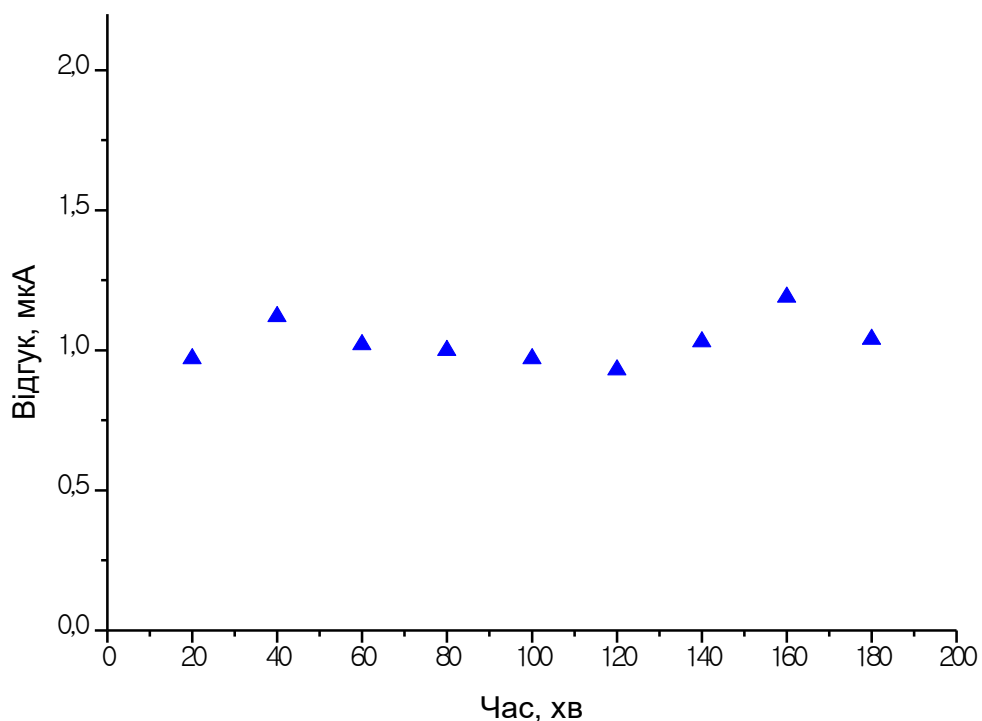


Рис. 3.3. Відтворюваність сигналів перетворювача на додавання у робочу комірку 8 мкМ пероксиду водню. Вимірювання проводили у 25 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0 при прикладанні потенціалу 0,5 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

3.2.4. Дослідження селективності амперометричних перетворювачів

Однією з найбільших проблем, що часто з'являються при проведенні аналізу реальних зразків за допомогою біосенсорів, є недостатня селективність перетворювачів, а саме - вплив на роботу амперометричних перетворювачів інтерферуючих сполук, присутніх майже у всіх біологічних рідинах. До таких електроактивних речовин відносяться зокрема аскорбіновата сечова кислоти тощо. Необхідно зазначити, що поява неспецифічного сигналу може бути зумовлена як неселективним відгуком біоселективної мембрани, так і реакцією на інтерферуючі речовини самого перетворювача. Вочевидь, селективність амперометричних перетворювачів, що застосовуються при розробці біосенсорів, повинна бути ретельно досліджена та, в разі необхідності, оптимізована. Тому наступною стадією запропонованої методики тестування амперометричних перетворювачів є дослідження чутливості біосенсорів на електроактивні речовини, що можуть бути присутні у біологічних рідинах.

Відомо, що найбільш проблематичною інтерферуючою речовиною є аскорбінова кислота, яка присутня в досить високих концентраціях у багатьох біологічних рідинах. Неспецифічний сигнал біосенсора на аскорбінову кислоту і подібні інтерферуючі компоненти зумовлена їх електрохімічним окисненням на поверхні електрода. Результати перевірки чутливості перетворювачів до аскорбінової кислоти зображені на рис. 3.4. Як видно з рисунку, вольтамперограми на амперометричних перетворювачах змінювались в залежності від внесення у вимірювальну комірку різних концентрацій аскорбінової кислоти (0, 1, 2, 5, 10 та 20 мМ).

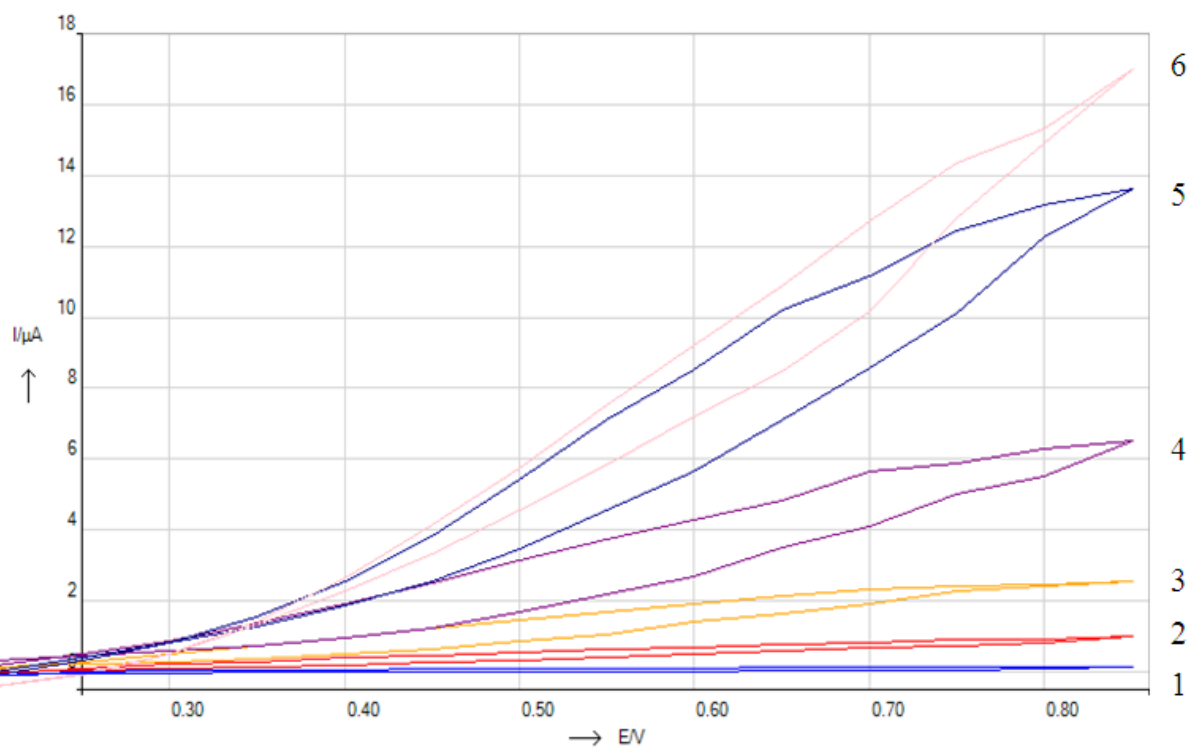


Рис. 3.4. Циклічні вольтамперограми отримані на амперометричному платиновому перетворювачі у 25 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0 (1) та при додаванні різних концентрацій аскорбінової кислоти: 1мМ (2), 2 мМ (3), 5 мМ (4), 10мМ (5) та 20 мМ (6).

По отриманим результатам, було побудовано залежність чутливості амперометричного перетворювача на основі платинового дискового електрода до 10 мМ аскорбінової кислоти від величини прикладеного робочого потенціалу (рис. 3.5).

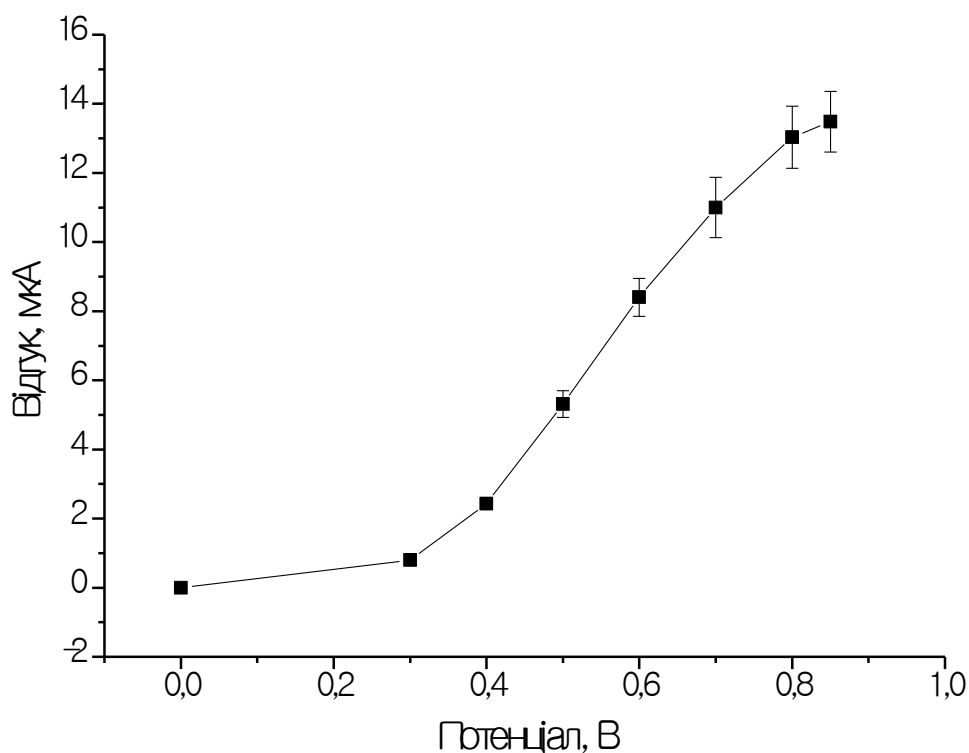


Рис. 3.5. Залежність величини відгуків амперометричного перетворювача на внесення у робочу комірку 10 мМ аскорбінової кислоти від прикладеного потенціалу (0-0,85В) відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Вимірювання проводили у 25 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0.

Слід зазначити, що на відміну від пероксиду водню, при збільшенні потенціалу, відгуки на аскорбінову кислоту зростають майже лінійно. Через те, що при меншому потенціалі відгуки електродів на аскорбінову кислоту значно менші, для роботи з реальними зразками, в яких можуть бути присутні електроактивні речовини такі, як аскорбінова кислота, необхідно обирати нижчий робочий потенціал.

Крім аскорбінової кислоти, ще одним інтерферентом, що зумовлює похибку результатів аналізу амперометричними біосенсорами, є етиловий спирт.

Аналогічно з дослідженням проведеним з аскорбіною кислотою, було виконано роботу щодо перевірки чутливості амперометричного перетворювача до етилового спирту (рис. 3.6).

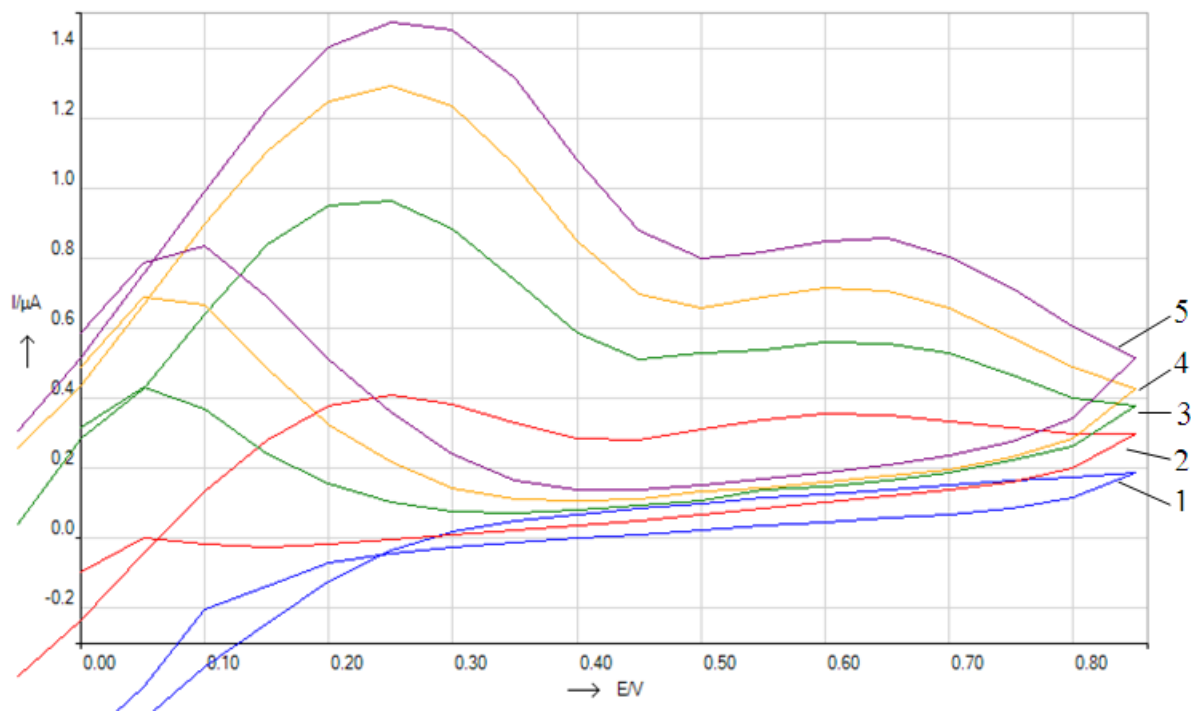


Рис. 3.6. ЦВА, отримані на амперометричному платиновому перетворювачі у 25 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0 (1), та при додаванні різних концентрацій етилового спирту: 400 мМ (2), 800 мМ (3), 1200 мМ (4) та 1600 мМ (5).

Використовуючи результати, отримані методом циклічної вольтамперограми, побудовано залежність чутливості амперометричного перетворювача на основі платинового дискового електрода до 800 мМ етилового спирту від величини прикладеного потенціалу (рис. 3.7).

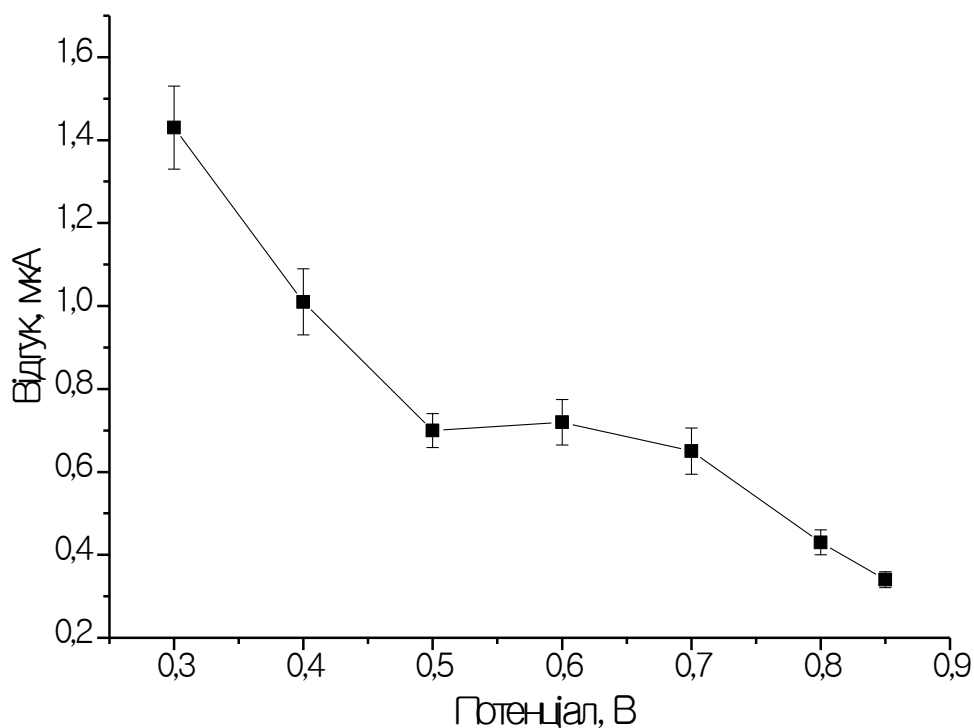


Рис. 3.7. Відгуки на додавання 800 мМ етилового спирту, отримані на платиновому перетворювачі у 25 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0 при прикладанні потенціалу від 0,1 до 0,85 В, відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Згідно отриманих результатів, відгук платинових перетворювачів на етиловий спирт є невисоким і практично не змінюється при зміні робочого потенціалу від 0,4 до 0,7 В, а, це, в свою чергу, дозволяє використовувати дані перетворювачі для аналізу зразків, в яких може бути присутній етиловий спирт.

Для більш детальної оцінки селективності амперометричних перетворювачів до пероксиду водню аскорбінової кислоти та етилового спирту, було побудовано калібрувальні графіки чутливості перетворювача до цих речовин (рис. 3.8). Результати порівняльного аналізу були отримані при

прикладанні робочого потенціалу 0,5 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння. Даний робочий потенціал було вибрано у попередніх експериментах, беручи до уваги чутливість перетворювача до пероксиду водню.

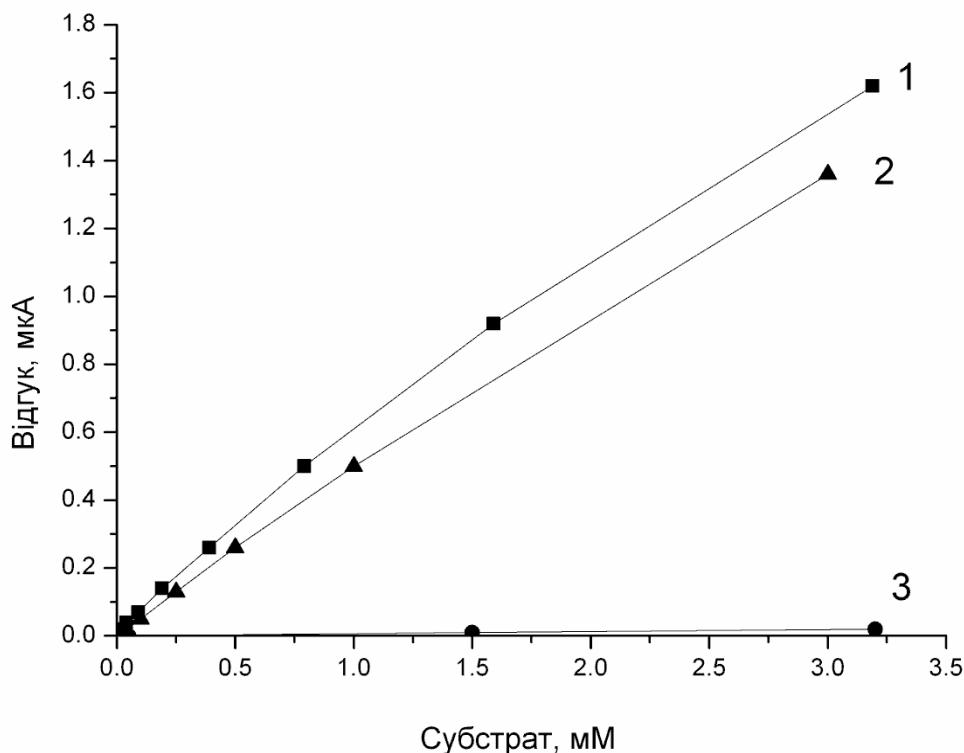


Рис. 3.8. Залежність величини відгуків платинових електродів від концентрацій пероксиду водню (1), аскорбінової кислоти (2) та етилового спирту (3) у вимірювальній комірці. Вимірювання виконували у 25 мМ робочому буферному розчині, рН 7,0 при робочому потенціалі 0,5 В, відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Згідно даних представлених на рисунку 3.8, при потенціалі 0,5 В відгуки на аскорбінову кислоту були досить високими порівняно із відгуками на пероксид водню. Відповідно, можна зробити припущення, що селективності перетворювача буде недостатньо для роботи із зразками, в яких

аскорбінова кислота буде присутня у високих концентраціях. В свою чергу, відгуків перетворювачів на внесення етилового спирту майже не було, що дає можливість використовувати ці сенсори для аналізу зразків, що містять етиловий спирт.

Для подолання суттєвого впливу аскорбінової кислоти на відгуки перетворювачів, застосовували модифікацію поверхні перетворювачів додатковою полімерною мембраною. Використання такої напівпроникної мембрани дозволяє проводити селективний біосенсорний аналіз в присутності інтерферуючих речовин в значних концентраціях.

3.2.5. Використання додаткових мембран для покращення селективності амперометричного перетворювача на основі дискового платинового електроду

В попередньому підрозділі було продемонстровано, що використані в роботі амперометричні перетворювачі є недостатньо селективні для подальшої розробки ферментного біосенсора на їх основі. Тому наступною стадією роботи було покращення його селективності за рахунок нанесення додаткових мембран. Для підвищення селективності перетворювачів та запобігання окисленню інтерферуючих речовин на поверхні електрода, використовують різні додаткові полімерні мембрани, які обмежують дифузю інтерферуючих речовин до електродної поверхні, пропускаючи при цьому лише цільову речовину (в нашому випадку це пероксид водню) [195–197].

Для покращення селективності даних перетворювачів застосовували поліфенілендіамінову (ПФД) мембрану, що була нанесена на поверхню робочого платинового дискового електрода за допомогою методу електрополімеризації. Переваги застосування поліфенілендіамінових мембран описані в попередніх статтях [169, 198]. Така мембрана утворює пори,

розміру яких достатньо для проходження пероксиду водню до поверхні електрода, та недостатньо для проходження більших за розміром речовин. Для формування ПФД мембрани, амперометричний перетворювач занурювали у 5 мМ розчин *m*-фенілендіаміну, після чого отримували 4-5 циклічних вольтамперограми (рис. 3.9). Як видно з рисунку, четверта і п'ята вольтамперограми були майже однаковими, що говорило про завершення формування шару ПФД на поверхні робочого електрода.

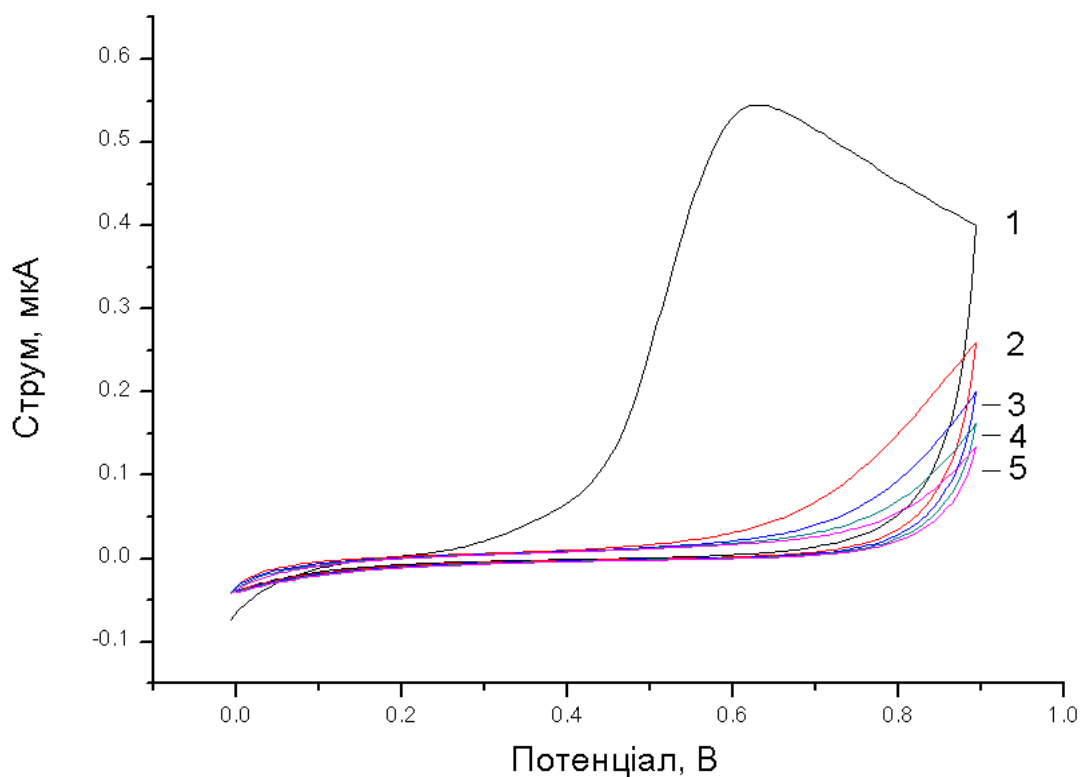


Рис. 3.9. Циклічні вольтамперограми, отримані в результаті формування шару полі- *m* -фенілендіаміну на поверхні платинового дискового електрода. 5 мМ *m*-фенілендіамін був розчинений у 10 мМ калій-фосфатному буферному розчині, рН 7,4. Початковий потенціал – 0 В, кінцевий потенціал - +0,9 В, швидкість зміни потенціалу – 20 мВ/с, крок зміни потенціалу – 5 мВ.

Для дослідження впливу полімерної мембрани на відгуки датчиків, було протестовано їх чутливість до пероксиду водню та інтерферуючих речовин до та після модифікації поліфенілендіаміном. Отримані результати наведено в таблиці 3.1. В якості інтерферуючих речовин використовували аскорбінову кислоту, етиловий спирт та ще низку речовин, що часто вносять похибку в роботу амперометричних біосенсорів, а саме: дофамін, цистеїн, сечова кислота та парацетамол.

Слід відмітити, що до нанесення ПФД мембрани перетворювач досить сильно реагував на інтерферуючі речовини. Відповідно до цього, могли виникати проблеми при використанні біосенсора на основі даного перетворювача при аналізі біологічних рідин. Однак, після нанесення ПФД мембрани, відгуки перетворювача на інтерферуючі речовини зникли зовсім або ж був незначних розмірів, при цьому чутливість цього перетворювача до перекису водню знижувалась лише на 20% (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Дослідження селективності амперометричних перетворювачів до та після нанесення ПФД мембрани

Сполука	Відгук без ПФД мембрани, нА	Відгук з ПФД мембраною, нА
Перекис водню, 50 мкМ	34,7 ± 2,6	27,6 ± 0,8
Аскорбінова кислота, 500 мкМ	33,2 ± 1,7	0,9 ± 0,5
Етиловий спирт, 1мМ	0,02 ± 0,02	0
Сечова кислота, 100 мкМ	10,6 ± 1,8	0
Парацетамол, 100 мкМ	7,3 ± 1,2	0
Цистеїн, 100 мкМ	2,8 ± 0,4	0,02 ± 0,02
Дофамін, 20 мкМ	14,8 ± 1,3	1,2 ± 0,3

3.2.6. Дослідження параметрів амперометричного біосенсора на основі модифікованих перетворювачів

Наприкінці проходження повного циклу тестування амперометричних перетворювачів за запропонованою методикою, необхідно було провести перевірку даних перетворювачів під час їхньої роботи у складі біосенсорів. Для цього, під час виготовлення біосенсорів, на модифіковані поліфенілендіаміном робочі електроди наносили біоселективну мембрану на основі іммобілізованого ферменту глюкозооксидази. Даний фермент було обрано у якості модельного, оскільки глюкозооксидаза (ГОД) є високо специфічним, стабільним та найбільш вивченим ферментом при використанні у біосенсоріці. На запропонованому біосенсорі на основі ГОД було отримано вольтамперограми в робочому буферному розчині, та при додаванні у вимірювальну комірку глюкози у концентрації 0,5 мМ (рис. 3.10). Ці вольтамперограми було порівняно з вольтамперограмою, отриманою на тому ж самому амперометричному перетворювачі без ферментної мембрани. Як видно з рис. 3.10, 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. 3.10, крива 3), що свідчить про роботу фермента, а відповідно і про те, що протестовані в нашій роботі амперометричні перетворювачі можуть успішно використовуватись при розробці біосенсорів.

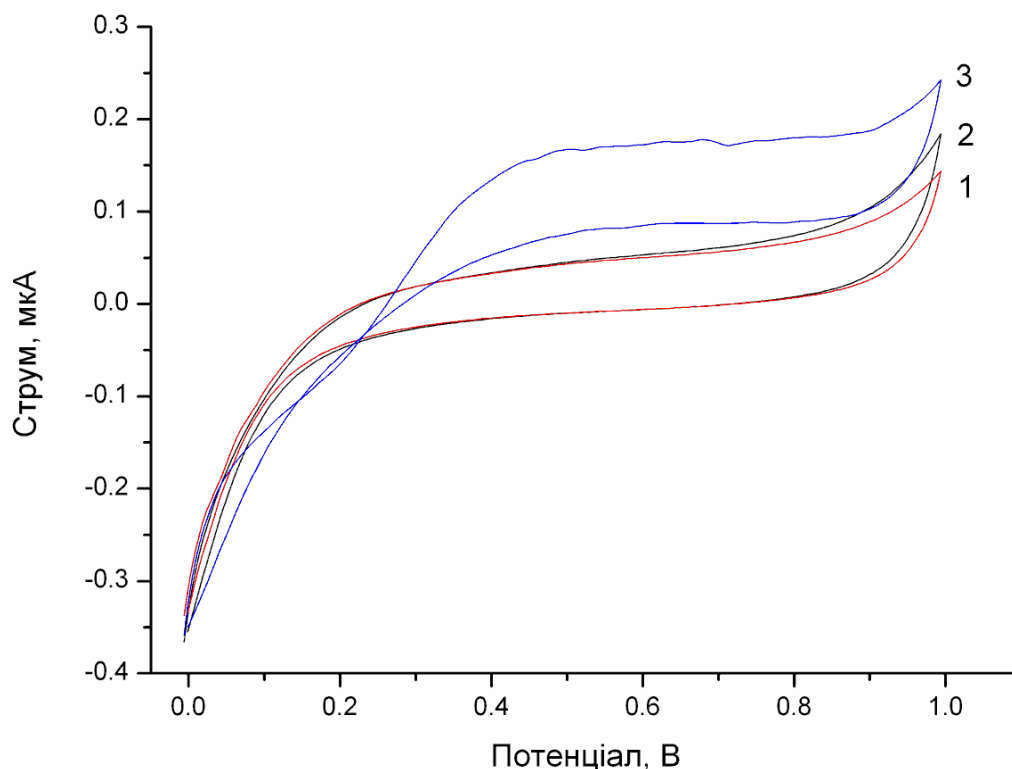


Рис. 3.10. ЦВА, отримані на амперометричному перетворювачі без нанесення ферментної мембрани (1), після нанесення ферментної мембрани на основі глюкозооксидази (2), та при додаванні 0,5 мМ глюкози у робочу комірку (3). Вимірювання проводили у 25 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0.

3.2.7. Підсумки

Таким чином, запропоновано універсальну методику тестування амперометричних перетворювачів, яку слід проводити перед розробкою будь-якого безмедіаторного ферментного біосенсора, в основі роботи якого лежить окиснення перекису водню. При тестуванні датчиків було досліджено основні аналітичні характеристики перетворювачів на основі дискового платинового

електроду методами циклічної вольтамперометрії та амперометричних вимірювань. Платинові електроди було перевірено на чутливість до перекису водню, етанолу та аскорбінової кислоти, обрано оптимальний потенціал роботи даних перетворювачів, досліджено відтворюваність сигналу амперометричного перетворювача та його селективність. Для покращення селективності перетворювачів на поверхню робочого електрода була нанесена додаткова поліфенілендіамінова мембрана, що значно знизило чутливість амперометричного перетворювача до ряду інтерферуєчих речовин. Показано, що амперометричні платинові перетворювачі за своїми характеристиками підходять для подальшого їхнього використання для розробки ферментних біосенсорів.

Запропонована методика збереже час та спростить процедуру попередньої перевірки амперометричних перетворювачів при розробці ферментних біосенсорів.

3.3. Дослідження та оптимізація вуглецевого амперометричного мікроперетворювача для створення *in vivo* біосенсорів

3.3.1. Вступ

На даний момент в світовій біосенсориці значні зусилля спрямовані на підвищення чутливості вуглецевих перетворювачів та мінімізацію неспецифічних впливів електроактивних речовин, тобто на модифікацію поверхні електрода та на створення напівпроникного селективного покриття, що перешкоджає доступу небажаних електрохімічно активних сполук до поверхні перетворювача. Вже повідомлялося про ефективні, але не досить працездатні комплекси таких мембран [199–201]. Однак, було продемонстровано, що використовуючи напівпроникні мембрани, можна

запобігти впливу деяких речовин, молекули яких мають електричний заряд, таких як аскорбінова і сечова кислоти. У той же час було показано, що у випадку речовин, що не мають заряду, наприклад таких як ацетамінофен, все ще дуже складно позбавитись їхнього впливу на роботу амперометричного перетворювача [199].

Для подолання обмежень, зумовлених необхідністю застосування високого робочого потенціалу, були розроблені металізовані вуглецеві електроди [202, 203], а також металізовані електроди, модифіковані електрохімічно осадженими полімерними мембранами [204, 205]. В основному такі перетворювачі, що працюють при низьких потенціалах, успішно застосовували при розробці глюкозних [206, 207], лактатних [208, 209] і глутаматних [208, 210] біосенсорів. В цьому сенсі, пониження потенціалу, за якого відбувається окислення перекису водню (за рахунок нанесення благородних металів на поверхню вуглецевого електроду), є, напевно, виправданим кроком. Проте треба відзначити, що більша частина вищезгаданих конструкцій біосенсорів відноситься до класу макроструктур (розміри робочої зони таких біосенсорів значно перевищують 100 мікрон. В області ж мікробіосенсорів на базі вуглецевого волокна, на сьогодні успішна іммобілізація ферменту в поєднанні з металізацією родієм [207], рутенієм [206], палладієм [211] та іридієм [212] обмежується лише глюкозними біосенсорами. Недоліком цього методу є недостатня селективність таких біосенсорів до деяких електроактивних речовин, які притаманні біологічному середовищу. Цей недолік найбільше проявляє себе у випадку платини, іридію та палладію внаслідок одночасного зменшення напруги окиснення, як для перекису водню, так і для співіснуючих електроактивних молекул (наприклад, аскорбінової і сечової кислоти). Родієві і рутенієві покриття, отримані електрохімічним нанесенням, навпаки, прискорюють окислювально-відновні реакції перекису водню, натомість значно менше –

можливих інтерферуючих речовин [202, 206, 207]. В той же час, привабливість каталітичних властивостей родієвих і рутенієвих шарів послаблюється їхньою низькою стабільністю [202]. Втім, було зазначено, що ці шари набувають значно більшої стабільності внаслідок процесу анодного окиснення, ніж катодного відновлення перекису водню [202].

Тому основною метою даного фрагменту роботи була розробка амперометричних перетворювачів на основі карбонових волокон з використанням металізації (рутенізації) та електрохімічного нанесення додаткових напівпроникних мембран для покращення як чутливості, так і селективності електроду.

3.3.2. Дослідження чутливості мікроперетворювача

Першим етапом цієї роботи було проведення металізації електродів для досягнення кращої чутливості перетворювача до перекису водню та, навпаки, зменшення чутливості до інтерферуючих речовин. Спочатку були проведені 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 перекису 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. 3.11). Максимум густини анодного струму з відповідною максимальною чутливістю до перекису водню спостерігався для електродів, металізованих при потенціалі -0,45 В, який і був застосований в подальшому для металізації електродів.

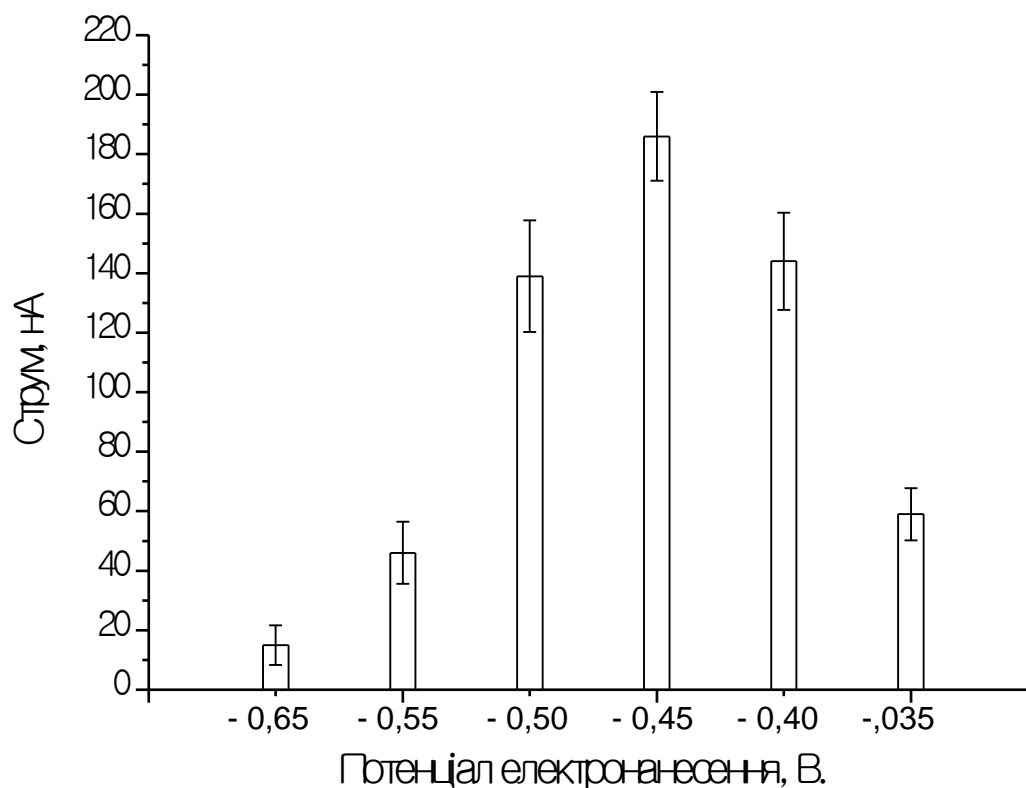


Рис. 3.11. Залежність чутливості до перекису водню металізованих рутенієм мікроелектродів, отриманих за різних величин потенціалів електронанесення каталітичного шару рутенію ($n=3$). Умови вимірювання: 1 мМ пероксид водню у 10 мМ фосфатному буфері (рН 7,4) при постійному потенціалі +0,4 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, $T=36^\circ\text{C}$.

На рис. 3.12 представлено циклічні вольтамперограми для вуглецевоволоконних електродів з та без рутенієвого покриття, отримані в 10 мМ фосфатному буфері, рН 7,4.

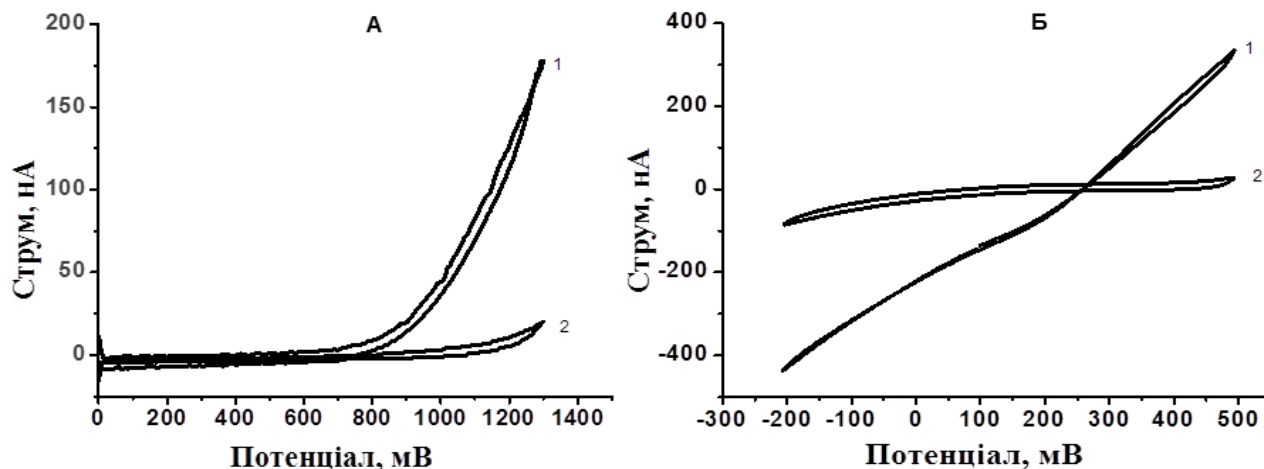


Рис. 3.12. Циклічні вольтамперограми, отримані для мікроелектродів – з металізацією рутенієм (Б) та без такої (А) у присутності 1 мМ перекису водню (1), та у буферному розчині (2). Умови вимірювання: 10 мМ фосфатний буфер (рН 7,4), розгортка потенціалу швидкістю 20 мВ/с., температура 36°C.

З рис. 3.12 б видно, що значний окислювальний струм для перекису водню спостерігається при напрузі, що перевищує +0,27 В. При нижчій напрузі відбуваються відновні процеси. Отримана точка переходу процесу відновлення в окиснення (+0,27 В) не узгоджується з раніше опублікованими даними, отриманими для рутенію, нанесеного на скло-вуглецеві електроди (+0,37 В) [202] і на вуглецеве волокно (+0,45 В) [206]. Цей зсув точки переходу пояснюється її залежністю від сполуки, у якій знаходиться благородний метал, і складу середовища при електронанесенні. Було показано, що нестабільність відновних властивостей рутенієвого шару, продемонстрована раніше [202], має місце і в нашому випадку, і тому напруга для роботи з металізованим мікроелектродом у +0,4 В була визнана як оптимальна (при цій напрузі фоновий струм ще залишається малим). На відміну від цього, в експериментах з непокритими вуглецево-волоконними електродами

окиснення пероксиду водню починається при значно вищих значеннях потенціалу (близько +0,8 В), при яких більшість електроактивних речовин, зазвичай присутніх у біологічних рідинах, буде впливати на роботу електроду [213].

На Рис. 3.13 представлено результати порівняння калібрувальних кривих визначення перекису водню за допомогою мікроперетворювача до та після його рутенізації. За отриманими даними видно, що величина відгуку, а відповідно, і чутливість мікроперетворювача до перекису водню зростала майже на два порядки після рутенізації (границя визначення пероксиду водню до та після металізації мікроперетворювача – 3 мкМ та 0,05 мкМ, відповідно).

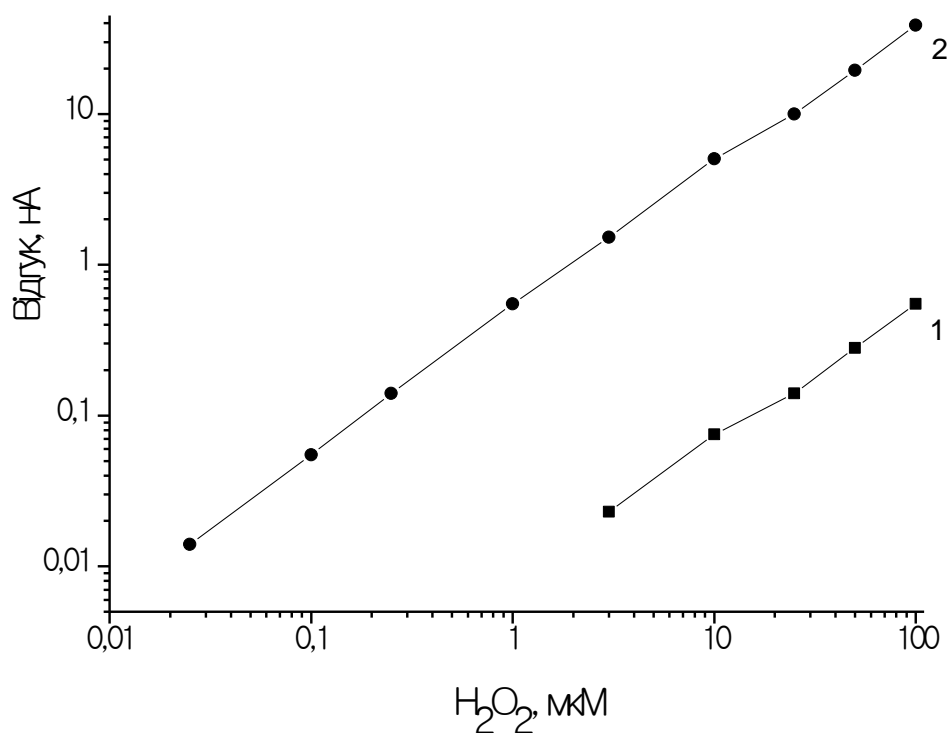


Рис. 3.13. Калібрувальні криві мікроперетворювача на перекис водню до (1) та після (2) рутенізації чутливої поверхні. Умови вимірювання: 10 мМ фосфатний буфер (рН 7,4) при постійному потенціалі у +0,4 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, $T=36^{\circ}C$.

Однак при обраній для рутенізованих електродів робочій напрузі +0,4 В, може відбуватися також окислення супутніх електроактивних компонентів (наприклад, аскорбінової кислоти), що спотворює результати визначення. Тому, наступним етапом дослідження було вивчення селективності розроблених перетворювачів.

3.3.3. Дослідження селективності вуглецевих мікроелектродів

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). Результати перевірки селективності мікроперетворювача до та після металізації представлено в табл. 3.2. 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 дофаміну.

Незважаючи на позитивні ефекти, отримані після металізації електродів, слід зазначити, що рутенізовані вуглецево-волоконні мікроелектроди все ж не є достатньо селективними до перекису водню для вимірювань *in vivo*. Тому для поліпшення селективності мікроелектродів було використано додаткові полімерні мембрани, отримані за рахунок електрополімеризації на поверхні рутенізованого електроду.

Таблиця 3.2

**Відгуки амперометричних мікроелектродів (n=3) до та після рутенізації
на перексид водню та інші електроактивні речовини**

Електроактивні речовини	Відгуки електроду на основі голого карбонового волокна, нА	Відгуки електроду на основі металізованого карбонового волокна, нА
Аскорбінова кислота, 500 мкМ	99,60±2,34	3,10±0,39
Сечова кислота, 100 мкМ	11,73±1,00	0,81±0,40
Аспарагінова кислота, 100 мкМ	0,00±0,05	0,00±0,05
Гомованілінова кислота, 100 мкМ	0,00±0,02	0,00±0,02
L-цистеїн, 100 мкМ	5,00±0,50	1,60±0,63
Ацетамінофен, 100 мкМ	7,27±0,89	0,20±0,20
Дофамін, 20 мкМ	0,99±0,05	4,81±0,70
Глутамін, 100 мкМ	0,00±0,02	0,00±0,02
Перекис водню, 50 мкМ	0,28±0,04	19,48±1,18

Серед усіх класів окси- та аміноароматичних речовин, здатних до електрополімеризації, в біосенсоріці найчастіше використовують ізомери фенілендіаміну [199, 200, 205, 214]. Було проведено ряд порівняльних досліджень щодо властивостей полімерних мембран на основі фенілендіаміну, отриманих з різних ізомерів (рис. 3.14). Результати, описані в літературі, щодо різних мономерів різняться між собою [205, 215–218], що очевидно пов'язане з тим, що на характеристики отримуваних полімерних мембран мають значний вплив як умови електрохімічного окиснення мономерів, так і робоча поверхня електроду, на якому утворюється полімерна плівка. Тому в нашій роботі було проведено порівняльне дослідження ізомерів фенілендіаміну при утворенні полімерної плівки на поверхні шару рутенію. Орто-, мета- і пара- ізомери фенілендіаміну були електрохімічно окиснені на поверхні вказаних електродів з утворенням напівпроникних полімерних мембран. В усіх випадках застосовували однакові умови

електроокиснення: 0,1 М концентрація мономеру в 0,1 М фосфатному буфері, рН 7,0, і процедура електроокиснення при постійній напрузі +0,7 В впродовж 45 хвилин за кімнатної температури.

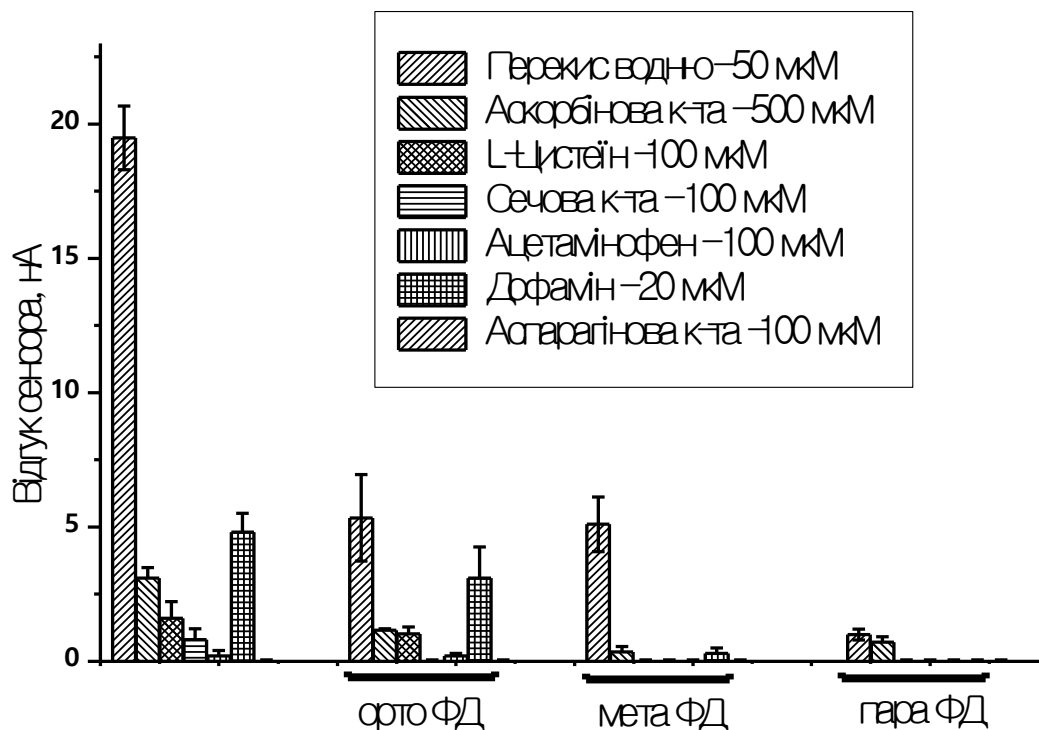


Рис. 3.14. Порівняння відгуків мікроелектродів (n=4) на основі рутенізованого вуглецевого волокна (без та з покриттям полімерними мембранами на основі різних ізомерів фенілендіаміну) до перексиду водню та ряду електроактивних речовин. Умови вимірювання: 10 мМ фосфатний буфер (рН 7,4) при постійному потенціалі у +0,4 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння, T=36 °C.

Було виявлено значні розбіжності у властивостях електродів з покриттям полімерами, отриманими з різних ізомерів фенілендіаміну. Перетворювачі з рутенієвим шаром, покриті мета-фенілендіаміновим полімером, демонстрували найкращу селективність до перекису водню. Це

узгоджується з даними, що були опублікованими раніше [204, 205]. Несподіваними були результати, отримані в наших експериментах з електродами, що мали мембрани, виготовлені з орто-фенілендіаміном. Така мембрана характеризувалася дуже обмеженою здатністю до виключення перешкод, на відміну від позитивних результатів, продемонстрованих для цього ізомеру в роботах [214, 219]. Мембрани, генеровані з пара-фенілендіаміном, також були не ефективними і це, вірогідно, є наслідком дуже обмеженої дифузії перекису водню через мембрану. Тож, в нашому випадку для рутенізованих електродів було обрано мета-фенілендіамін, як найкращий з ізомерів фенілендіаміну, використаних для нанесення додаткової напівпроникної мембрани на каталітичний шар рутенію.

3.3.4. Дослідження стабільності мікроелектродів, покритих полі-мета-фенілендіаміном

Як відомо з літературних джерел, властивості полімерів, електрогенерованих на поверхнях електродів, можуть змінюватись під час зберігання [218]. В нашому випадку перевірялась стабільність електродів, покритих полі-мета-фенілендіаміном, шляхом оцінки їхніх відгуків на пероксид водню та аскорбінову кислоту від часу зберігання в робочому буфері за температури 36 °С. Як видно з рис. 3.15, електроди з електрогенерованим полімером виявляли збільшення відгуку на пероксид водню впродовж перших 2-3 годин. Після 3 годин сигнал електродів стабілізувався і залишався стабільним більше 50 годин безперервного знаходження у буферному розчині. Крім того, величина відгуку мікроперетворювача на 500 мкМ аскорбінову кислоту залишалась стабільною на рівні похибки вимірювання. Отже, така конструкція перетворювачів може

бути успішно використана для безперервних вимірювань впродовж принаймні 50 годин.

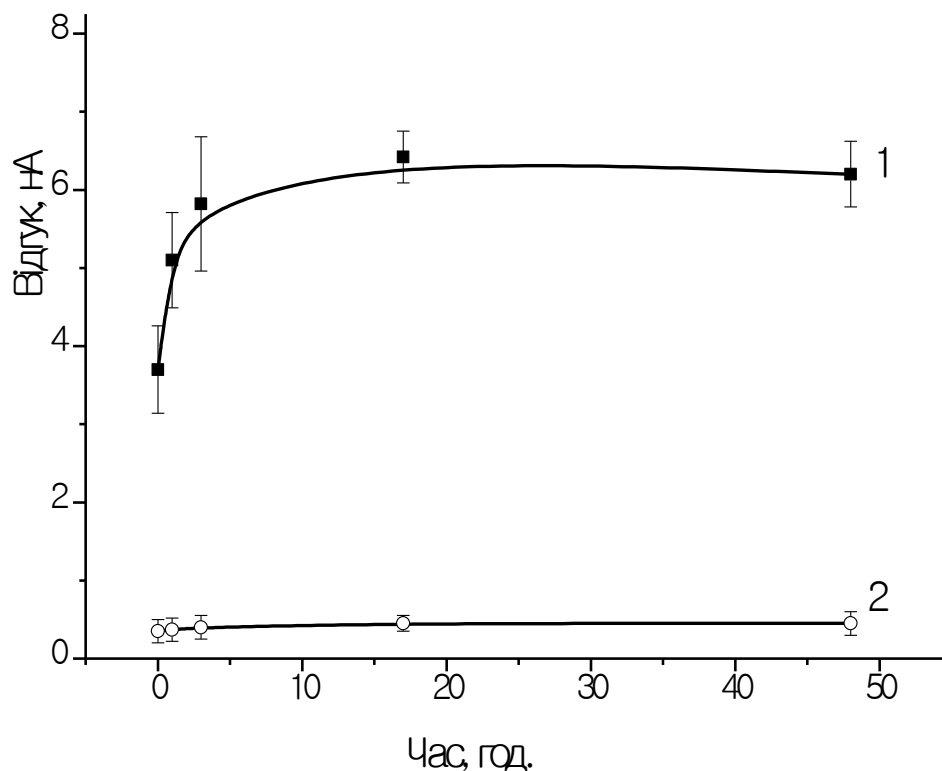


Рис. 3.15. Операційна стабільність відгуків рутенізованих мікроелектродів ($n=3$) на основі вуглецевого волокна вкритих полімерною мембраною на основі полі-мета-фенілендіаміну на 50 мкМ пероксид водню (1) та 500 мкМ аскорбінову кислоту (2). Умови вимірювання: 10 мМ фосфатний буфер (рН 7,4) при постійному потенціалі у +0,4 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, температура 36°C.

3.3.5. Перевірка працездатності мікробіосенсора на основі модифікованого перетворювача

В роботі також було проведено аналіз поетапного впливу усіх модифікацій амперометричних мікроелектродів на їхню чутливість до

пероксиду водню і селективність відносно можливих інтерферентів. Для дослідження цих характеристик ми перевіряли чутливість перетворювачів до 50 мкМ H_2O_2 та 500 мкМ аскорбінової кислоти (модель інтерферента) до та після кожної модифікації електродів (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Вплив різних варіантів модифікації мікроелектродів на їх чутливість та селективність (n=4)

Модифікація мікроелектродів на основі карбонового волокна	Відгук на 50 мкМ H_2O_2 , нА	Відгук на 500 мкМ аскорбінову кислоту, нА	Похибка яку може вносити аскорбінова кислота при експериментах <i>in vivo</i> , %
Без модифікації	0,28±0,04	96,60±2,34	34500
Рутенізація	19,48±1,18	3,10±0,39	15,91
Рутенізація + мета-фенілендіамін	5,10±1,02	0,35±0,25	6,86
Рутенізація + мета-фенілендіамін + ЛОД	4,24±1,1	0,17±0,15	4,01

За отриманими даними було визначено похибку, яку може вносити лише аскорбінова кислота при використанні розроблених мікробіосенсорів для аналізів *in vivo*. Як видно з результатів представлених в табл. 3.3, використання запропонованої в даній роботі схеми модифікації мікроелектродів на основі вуглецевого волокна, допоможе зменшити вплив інтерферуючих речовин відносно відгуку на перексид водню, в декілька тисяч разів.

Для перевірки ефективності роботи модифікованих мікроелектродів у складі біосенсорів на основі оксидоредуктаз (що каталізують окиснення субстратів з накопиченням пероксиду водню як одного із продуктів реакції) було розроблено мікробіосенсори на основі лактатоксидази (ЛОД) для визначення лактату. Типова залежність відгуку лактатного мікробіосенсора

від концентрації субстрату у відкритій комірці з перемішуванням представлена на рис. 3.16.

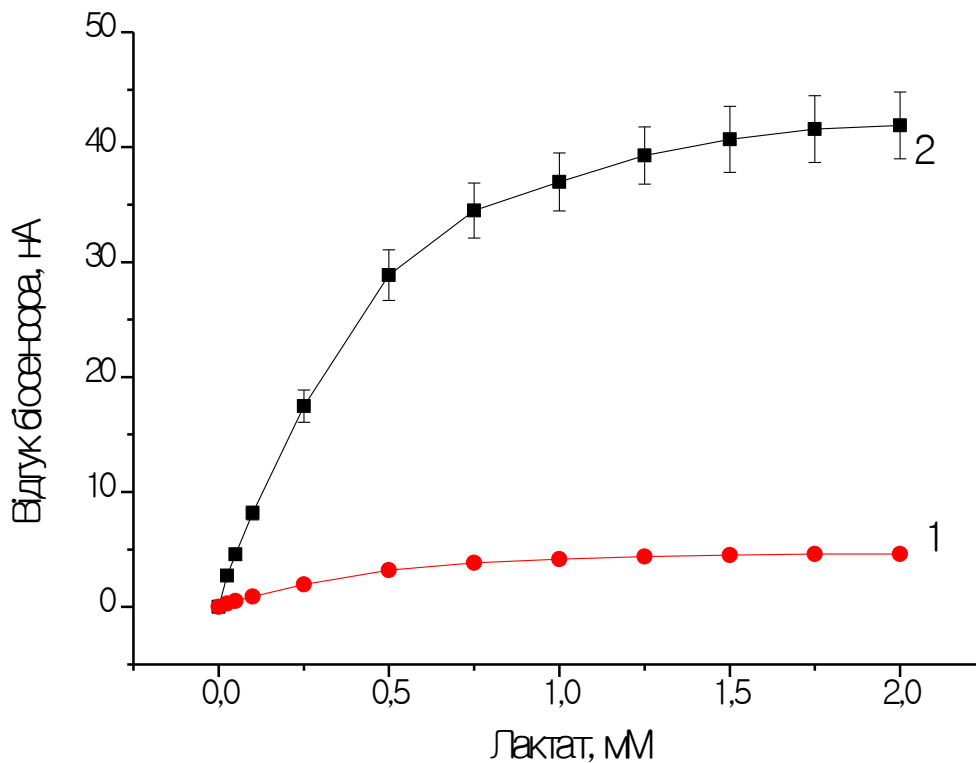


Рис. 3.16. Калібрувальні криві для мікробіосенсорів, чутливих до лактату, до (1) та після (2) модифікації мікроперетворювача. Умови вимірювання: 10 мМ фосфатний буфер (рН 7,4) при постійному потенціалі у +0,4 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, температура 36°C.

Для порівняння приведено калібрувальну криву лактатного біосенсора на основі немодифікованого перетворювача (без рутенізації та без нанесення полі-мета-фенілендіаміну). Як видно з рис. 3.16, попередня модифікація амперометричного мікроперетворювача дійсно сильно впливала на аналітичні характеристики біосенсора, створеного на їхній основі.

3.3.6. Підсумки

Досліджено перспективність модифікації амперометричного вуглецевого мікроелектрода з метою збільшення чутливості та покращення селективності. Встановлено, що використовуючи вуглецево-волоконні мікроелектроди з покриттям шаром рутенію і напівпроникною полімерною плівкою полі-мета-фенілендіаміну, можна отримати високочутливі амперометричні мікроперетворювачі з вираженою селективністю до пероксиду водню. Крім того, такий мікроперетворювач, покритий ферментним біоселективним шаром на основі лактатоксидази, давав можливість виготовлення мікробіосенсорів, високо специфічних і чутливих до лактату. Заміна ж лактатоксидази в біоселективній мембрані на іншу оксидоредуктазу дасть можливість отримати біосенсор, селективний до іншої речовини (глюкоза, глутамат, холін та ін.).

3.4. Методика тестування кондуктометричних перетворювачів для подальшого біосенсорного використання

3.4.1. Вступ

З-поміж електрохімічних біосенсорних методів визначення кондуктометричний метод характеризується низкою переваг, таких як, наприклад, відсутність електродних електрохімічних реакцій та електродів порівняння, можливість запобігання фарадеївським процесам на електродах, та використання змінної напруги малої амплітуди [220].

Найбільш ефективними конструкціями кондуктометричних перетворювачів що використовуються при створенні біосенсорів, є гребінчасті електроди. Вони являють собою мініатюрні сенсори, виготовлені

на основі двох зустрічно-гребінчастих планарних металевих електродів, і використовуються для аналізу провідності приелектродного шару [221, 222].

При використанні кондуктометричних біосенсорів, застосовують диференційний режим вимірювань, що дозволяє уникати впливу на величину сигналу фонові провідності, температури середовища та інших параметрів [192].

Під час використання кондуктометричних перетворювачів на практиці, було виявлено ряд факторів, що мають негативний вплив на проведення кондуктометричних вимірювань. До таких проблем можна віднести недостатню чутливість та погану диференційність перетворювачів, що зумовлено недосконалою технологією їх виготовлення, а також, поганою очисткою робочих поверхонь, механічними пошкодженнями при експлуатації та ін. [223, 224]. Відповідно існує потреба у створенні методики попереднього аналізу параметрів кондуктометричних перетворювачів, від яких напряму залежить можливість створення конкурентноспроможних біосенсорів. Методика повина містити ряд процедур, що дозволять оцінювати перспективність подальшого використання конкретного перетворювача в складі біосенсорів.

3.4.2. Дослідження чутливості кондуктометричних перетворювачів

В роботі використали методику імпедансної спектроскопії, за допомогою якої визначають чутливість системи до зміни провідності за різних частот змінного струму [225]. Хлорид калію є оптимальною речовиною для тестування КП. Його зручність у використанні пояснюється близькими значеннями граничної еквівалентної провідності іонів K^+ , Cl^- ($\lambda_{K^+}=73,5 \cdot 10^4 \text{ Ом}^{-1}\text{м}^2 \text{ моль}^{-1}$, $\lambda_{Cl^-}=76,3 \cdot 10^4 \cdot \text{Ом}^{-1}\text{м}^2\text{моль}^{-1}$ при 25°C) та коефіцієнтів дифузії ($D_{K^+}=1,96 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}\text{м}^2$, $D_{Cl^-}=2,04 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}\text{м}^2$) [226]. Тестування

проводили для двох груп електродів, виготовлених із золота та платини. В результаті такої перевірки отримували імпедансні спектри для водних розчинів хлориду калію різної концентрації. На рис. 3.17 представлено отримані результати, що мають вигляд залежності реальної частини адмітансу від концентрації хлориду калію для двох пар електродів кондуктометричного перетворювача на різних частотах вимірювання - 10, 50 та 100 кГц.

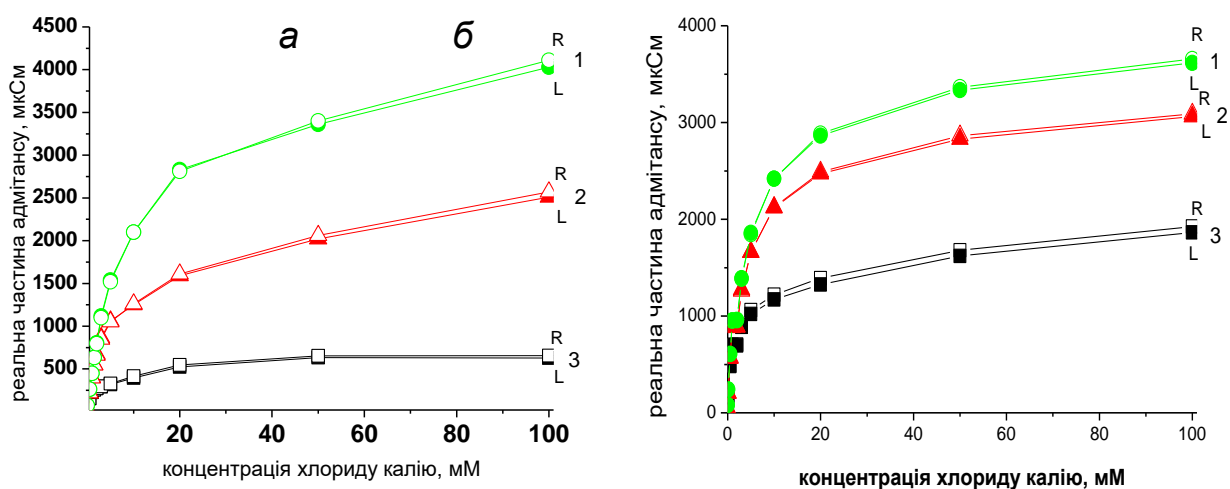


Рис. 3.17. Графіки залежності реальної складової адмітансу від концентрації хлориду калію отримані на різних частотах: 100 кГц (1), 50 кГц (2), 10 кГц (3), для правої (R) та лівої (L) пари електродів з золота (а), та платини (б).

Як видно з рис 3.17, зміна реальної частини адмітансу при додаванні у робочу комірку хлориду калію, збільшується із підвищенням частоти струму в залежності від металу перетворювача. Розбіжність відгуків лівої та правої пари електродів свідчить про якість кондуктометричного перетворювача: чим вищий показник цієї розбіжності, тим більш неінформативного вкладу в сигнал можна отримати при роботі в диференційному режимі.

Чутливістю електродної пари перетворювача називається відгук на одиницю внесеного аналіту (в випадку внесення солі це $\Delta Y_{Re}/\Delta C_{KCl}$), що чисельно визначається похідною від концентраційної залежності, наведеної на рис. 3.17. Візьмемо дану похідну чисельно і приведемо її значення для однієї з пар електродів типових перетворювачів з золота та платини (рис. 3.18).

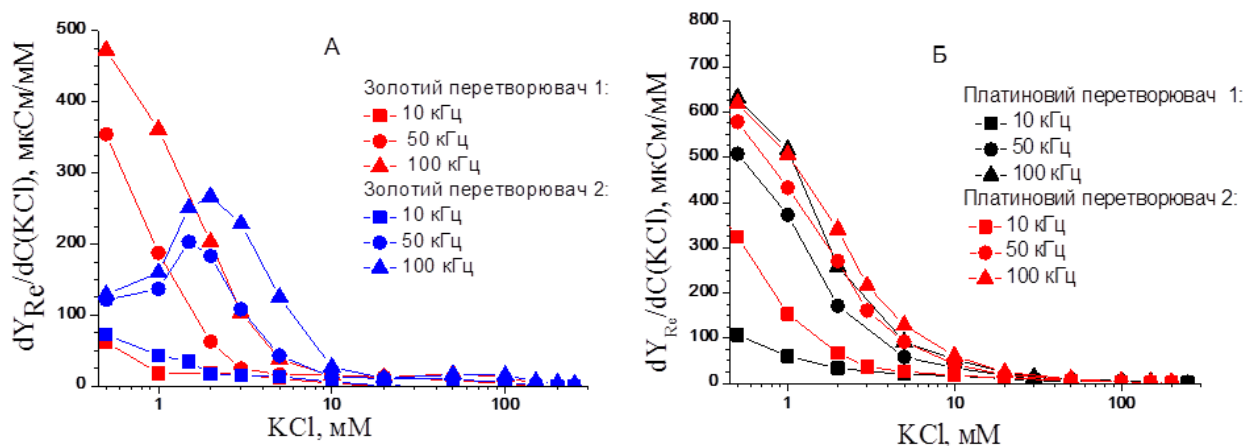


Рис. 3.18. Графік залежності чутливості кондуктометричних перетворювачів із золота (а), платини (б) від концентрації хлориду калію у вимірювальній комірці.

Аналізуючи дані, представлені на рис. 3.18, видно, що показник $dY_{Re}/dC(KCl)$, який описує чутливість до хлориду калію є найвищим у КП з платини. Окрім того, виконавши відповідний експеримент і проаналізувавши отримані результати, можна відібрати для подальшої роботи найкращі перетворювачі і видалити брак. Наприклад, з графіків (рис. 3.17) видно, що КП «Au2» має суттєво нижчу чутливість до хлориду калію ніж інші КП. Це свідчить про можливі дефекти їх виготовлення (неоднорідність підшару хрому, що використовується для покращення адгезії золота або порушення температурного режиму вакуумного наплення, тощо), або пошкодження поверхні чутливої частини перетворювача при використанні. Тому, необхідно

уникати використання таких КП при подальшому створенні мультиферментних біосенсорів.

3.4.3. Дослідження ідентичності пар електродів кондуктометричних перетворювачів

Диференційний режим вимірювання базується на детекції різниці сигналів з робочої та референтної мембран біосенсора. Використання даного режиму дозволяє підвищити чутливість сенсора, мінімізувати шуми та інші неінформативні впливи (температура, рН, світло та ін.). Ключовим параметром для роботи КП в диференційному режимі є ідентичність обох пар електродів. Неідентичність пар електродів може бути спричинена, наприклад, недосконалою технологією виготовлення, механічним пошкодженням або забрудненням активних поверхонь кондуктометричних перетворювачів.

Для забезпечення належної роботи кондуктометричного перетворювача в диференційному режимі, необхідно щоб різниця між відгуками двох пар електродів одного перетворювача була невеликою і постійною. Якщо різниця відгуків майже не змінюється в залежності від зміни концентрації аналізованого розчину, то диференційний режим працює ефективно і може пригнічувати неінформативний сигнал. Різницю відгуків між двома парами

електродів розраховують за формулою: $\left(\frac{Y_{\text{Re}(L)} - Y_{\text{Re}(R)}}{Y_{\text{Re}(L)}} \right) \cdot 100$, де $Y_{\text{Re}(L)}$ та

$Y_{\text{Re}(R)}$ – реальні складові адмітансу по лівій та правій парі електродів відповідно. За цим параметром було протестовано КП, виготовлених з золота та платини (рис. 3.19). За межу критичної розбіжності значень реальної складової адмітансу між парами електродів приймають 3% відхилення.

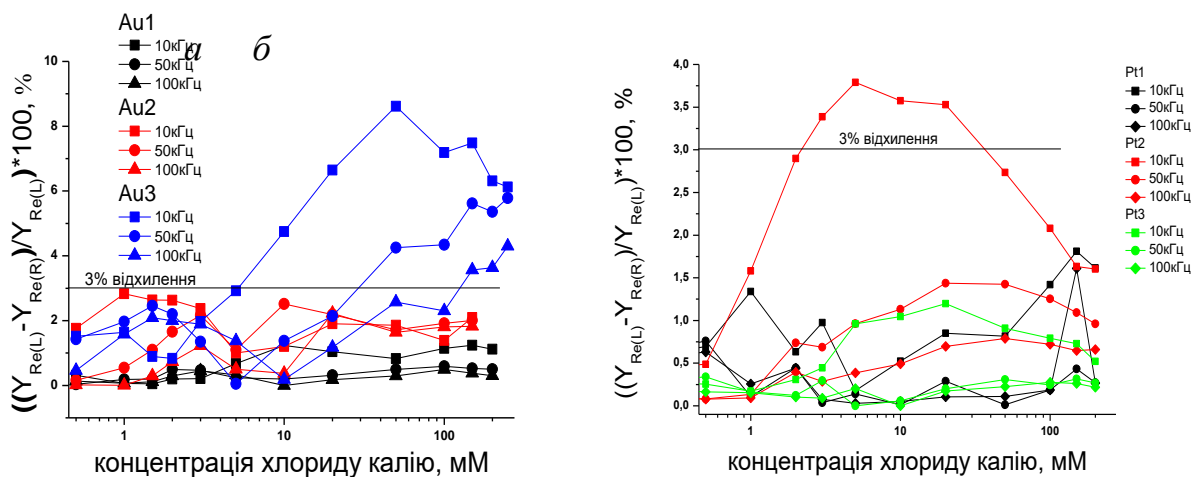


Рис. 3.19. Графіки залежності різниці реальної складової адмітансу між парами електродів КП із золота (а), та платини (б) від концентрації хлориду калію у вимірювальній комірці.

Встановлено, що різниця між відгуками на хлорид калію обох пар електродів (R і L) основної частини перетворювачів знаходились в межах 3%. Лише для КП «Au3» та «Pt2» ця розбіжність чутливості пар електродів перевищувала значення 3%. Тож, для уникнення використання КП, що характеризуються різницею чутливості пар електродів понад 3%, такі перетворювачі було відбраковано.

3.4.4. Оцінка співвідношення шум/сигнал кондуктометричних перетворювачів

Для коректної роботи перетворювача необхідно також оцінювати співвідношення його сигналу і шуму. Така оцінка проводиться наступним чином. В якості малого параметра обирається вузький діапазон концентрації ΔC_{KCl} , що відповідає поділці шкали (для платинового перетворювача Pt2 $\Delta C_{KCl} \sim 0,1$ мМ. Корисний сигнал ототожнюється з чутливістю біосенсора $S =$

$dY_{\text{Re}}/dC_{\text{KCl}}$. Шум дрейфу базової лінії вважається рівним різниці чутливостей каналів (ΔS) та варіацією показів по лівій і правій границі поділки (δS).

$$\text{Шум} = \delta S + \Delta S = \frac{d^2 |Y_{\text{Re}}^R - Y_{\text{Re}}^L|}{dC_{\text{KCl}}^2} \Delta C_{\text{KCl}} + |S_R - S_L|$$

При проведенні досліджень було встановлено дві закономірності. По-перше, кондуктометричні перетворювачі при роботі за високих частот, мали співвідношення сигнал/шум набагато краще, ніж при роботі на низьких частотах. По-друге, робота перетворювачів в насичених сольових розчинах була менш стабільною.

3.4.5. Порівняння функціональності кондуктометричного перетворювача в диференційному та моно режимах роботи

Для порівняння чутливості лівої та правої пар електродів КП застосували стаціонарну експериментальну установку для кондуктометричних вимірювань. Слід відмітити, що така установка дозволяє проводити вимірювання як в диференційному, так і в моно режимах.

В роботі в диференційному та моно режимах було протестовано низку КП, виготовлених на основі платини та золота. За допомогою усіх перетворювачів, на трьох частотах (10, 50 та 100 кГц) було отримано відгуки на додавання у вимірювальну комірку хлориду калію різних концентрацій. Отримані дані представлені на рис. 3.20.

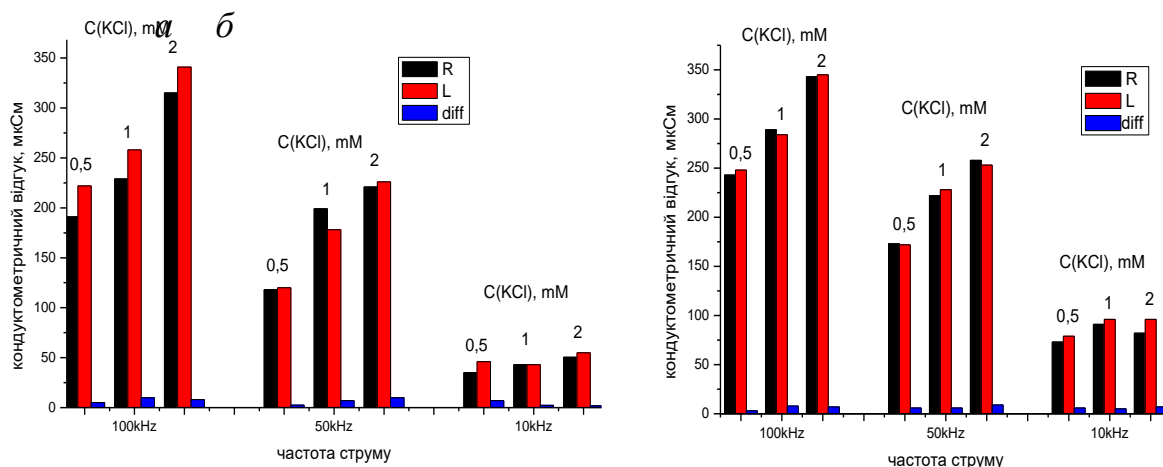


Рис. 3.20. Діаграми частотної залежності чутливості пар електродів типових КП із золота (а), та платини (б) від концентрації хлориду калію, одержані в моно (L або R) та диференційному режимах (diff).

Видно, що відгук кондуктометричного перетворювача на внесення хлориду калію зростає з підвищенням частоти струму. На частоті 100 кГц відзначається найбільший приріст відгуку, а на частоті 10 кГц – найнижчий. Відповідно, для забезпечення найбільшої чутливості, краще проводити роботу КП на високих частотах.

За рахунок можливості проводити вимірювання кожною з пар електродів окремо на даній установці, можна також оцінити і розбіжність відгуків між парами електродів КП. Наприклад, для типового КП з платини диференційна здатність виявилась найвищою порівняно із золотом.

Таким чином показано, що такі тестувальні процедури можна проводити і при використанні стаціонарної експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань.

3.4.6. Підсумки

В роботі розроблено методику тестування кондуктометричних перетворювачів, що здатна забезпечити простий і швидкий відбір оптимальних за своїми характеристикам перетворювачів, для використання у складі біосенсорних систем. Запропонована методика дозволяє, визначивши залежність провідності від концентрації солі, отримати ряд важливих робочих характеристик перетворювача: чутливість перетворювача, ідентичність його каналів, співвідношення шум/сигнал.

З використанням розробленої методики було протестовано кондуктометричні перетворювачі на основі електродів із золота та платини на різних частотах (10, 50, 100 кГц). Встановлено, що запропонована методика тестування кондуктометричних перетворювачів здатна систематизувати, значно полегшити, та зменшити час при виборі кондуктометричних перетворювачів на етапі розробки кондуктометричних біосенсорів.

3.5. Порівняльний аналіз функціонування двох портативних потенціостатів при роботі з амперометричними біосенсорами

3.5.1. Вступ

Метою даної частини роботи було порівняти характеристики портативного потенціостату, розробленого та виготовленого в Інституті електродинамики НАН України згідно наших рекомендацій, із потенціостатом PalmSens (Нідерланди) для встановлення того, чи здатен потенціостат українського виробництва замінити PalmSens при роботі з біосенсорами. Зокрема, робота була націлена на порівняння аналітичних характеристик сенсорів та біосенсорів при амперометричному визначенні

пероксиду водню та глюкози. Для визначення було обрано пероксид водню, оскільки саме він часто виступає одним з продуктів реакцій, що мають місце в ферментних амперометричних біосенсорах, а його окиснення на поверхні електродів генерує сигнал таких біосенсорів [101]. Глюкоза є найбільш поширеною речовиною, яку визначають за допомогою біосенсорів, оскільки потреба у визначенні вмісту глюкози в крові діабетиків та інших хворих постійно зростає. Біосенсиори для визначення глюкози речовини були створені одними з перших, і продовжують розроблятися в багатьох лабораторіях світу [227].

3.5.2. Дослідження чутливості перетворювачів до пероксиду водню за допомогою циклічних вольтамперограм

Чутливість амперометричних перетворювачів до пероксиду водню є дуже важливим параметром при створенні біосенсорів, що базуються на вимірюванні пероксиду водню як продукту ферментативної реакції. Висока чутливість перетворювача стосовно пероксиду водню приведе до високої чутливості біосенсора до досліджуваної речовини. Тому першим етапом даної роботи було порівняння 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.

Метод циклічної вольтамперометрії забезпечує аналіз чутливості перетворювачів до певних субстратів при різних потенціалах. Тому, застосовуючи метод циклічної вольтамперометрії, можна обирати оптимальний робочий потенціал для амперометричних вимірювань.

При проведенні експерименту, спочатку отримували 1-2 циклічні вольтамперограми у чистому робочому буфері, після чого до комірки додавали 0,5 мМ пероксид водню і отримували ще 3-4 вольтамперограми. Умови проведення циклічних вольтамперограм були однаковими для обох потенціостатів. Типові циклічні вольтамперограми обох потенціостатів зображені на рис. 3.21.

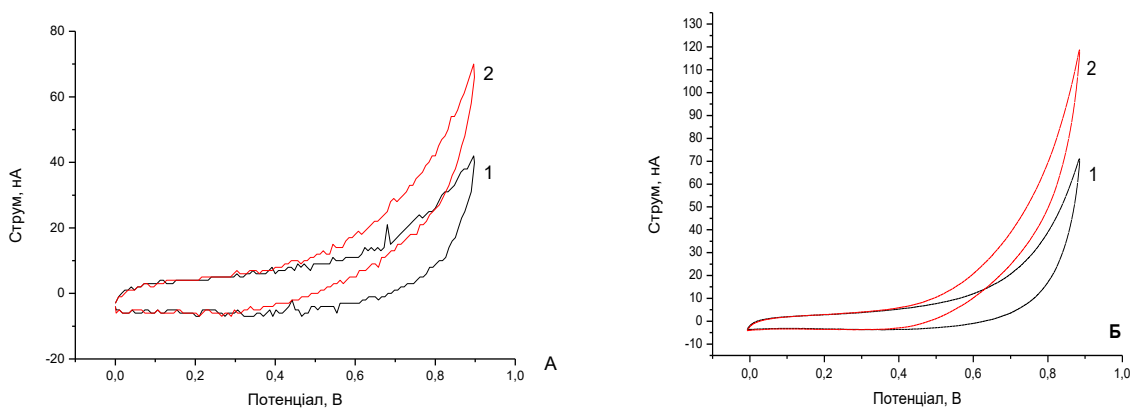


Рис. 3.21. ЦВА, отримані до (1) та після (2) додавання до комірки пероксиду водню при використанні потенціостату українського виробництва (А) та PalmSens (Б). Концентрація H_2O_2 у робочій комірці – 0,5 мМ. Початковий - 0 В, кінцевий – 0,9 В відносно внутрішнього електрода порівняння. Крок зміни потенціалу – 0,008 В, швидкість зміни потенціалу – 0,02 В/с.

Як видно з рис. 3.21, потенціостат PalmSens демонстрував менший рівень шуму, плавнішу вольтамперограму і мав більшу чутливість до пероксиду водню, у порівнянні з потенціостатом українського виробництва. І в першому і в другому випадках, значне збільшення сигналу при додаванні пероксиду водню спостерігається при потенціалі від +0,6 В.

3.5.3. Дослідження діапазону визначення пероксиду водню на різних потенціостатах

Наступним етапом порівняння двох установок було вимірювання відгуків голих перетворювачів на 0,5 мМ H_2O_2 у 5 мМ фосфатному буферному розчині при потенціалі 0,8 В відносно внутрішнього електрода порівняння. Для цього, у буферному розчині протягом 30 секунд отримували базову лінію, після чого до робочої комірки додавали 0,5 мМ H_2O_2 і проводили вимірювання ще протягом 30-50 секунд. Відгуки сенсорів представлені на рис. 3.22.

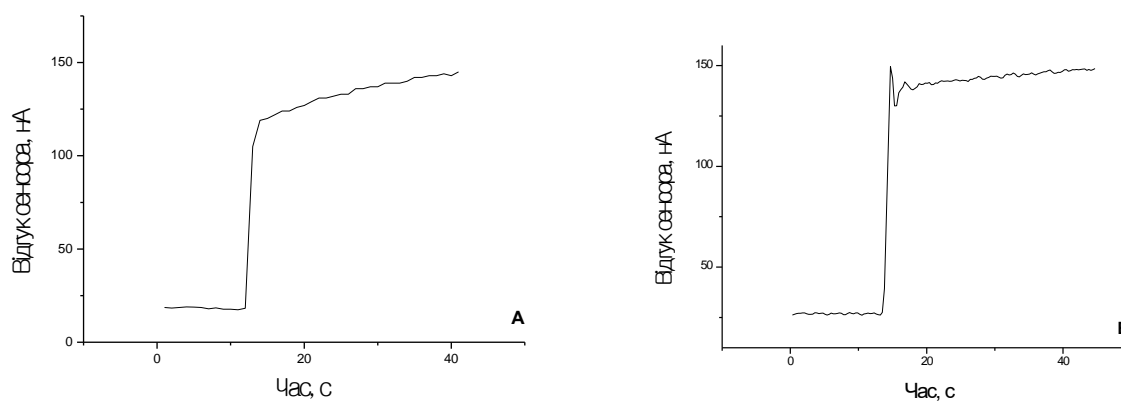


Рис. 3.22. Відгуки сенсорів на додавання пероксиду водню, отримані із використанням потенціостату українського виробництва (А) та PalmSens (Б). Концентрація H_2O_2 у робочій комірці – 0,5 мМ, потенціал 0,8 В відносно внутрішнього електрода порівняння.

Як видно з рисунка 3.22, обидві установки демонстрували майже однакові відгуки, проте потенціостат PalmSens мав менший дрейф сигналу.

Також, було отримано калібрувальні криві на перекис водню, необхідні для оцінки чутливості перетворювача та потенціостату до різних концентрацій перекису водню. Калібрування проводилось додаванням до робочої комірки 0,2 мМ H_2O_2 кожні 30 секунд при потенціалі 0,8 В відносно

внутрішнього електрода порівняння. Отримані калібрувальні криві наведені на рис. 3.23.

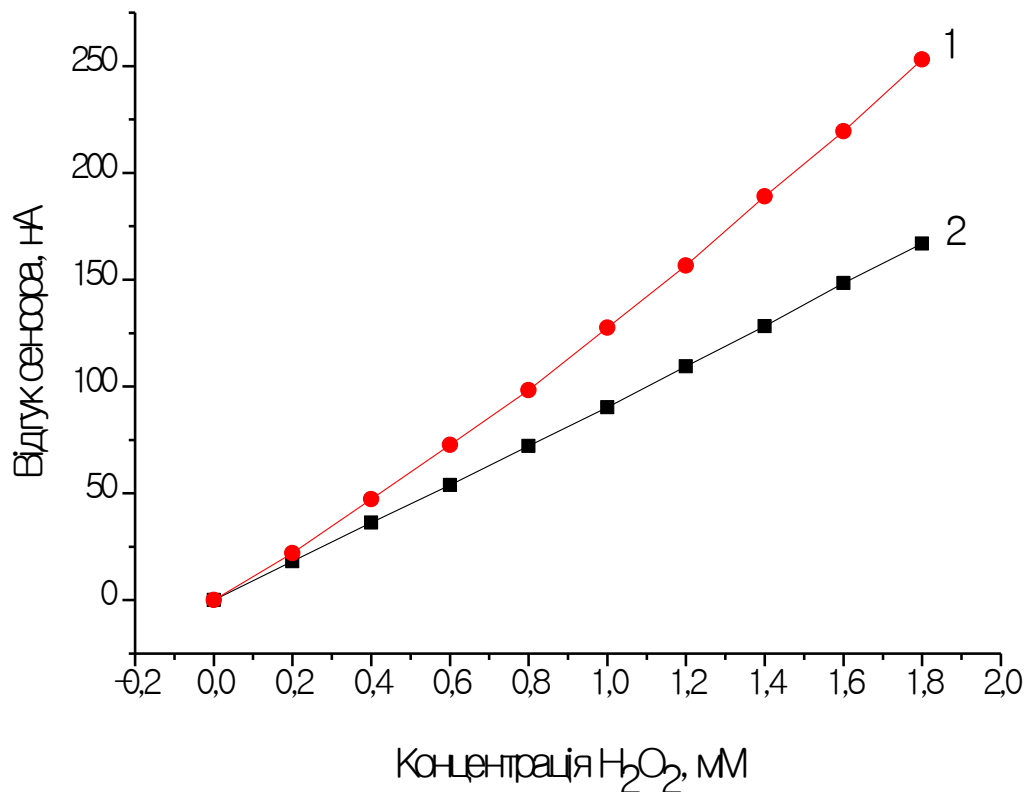


Рис. 3.23. Калібрувальні криві сенсорів для визначення пероксиду водню, отримані із використанням PalmSens (1) та потенціостату українського виробництва (2). Потенціал 0,8 В відносно внутрішнього електрода порівняння.

З рисунка видно, що відгуки сенсорів були прямо пропорційні концентрації пероксиду водню у всьому діапазоні концентрацій, причому чутливість PalmSens була дещо більшою. Однак, слід зазначити, що чутливості потенціостату українського виробництва було цілком достатньо для достовірного визначення концентрації пероксиду водню.

3.5.4. Дослідження відтворюваності відгуків амперометричних сенсорів на різних потенціостатах

Важливою характеристикою сенсорів та потенціостатів є відтворюваність відгуків при додаванні одних й тих самих 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 перексид водню. Для цього, впродовж декількох годин безперервної роботи отримували відгуки на одну і ту ж саму концентрацію перексиду водню (0,5 мМ). Час одного відгуку складав близько 1 хв., проміжок між відгуками - близько 3 хв., протягом цього часу перетворювач і робочу комірку відмивали від перексиду водню шляхом триразової заміни робочого буферного розчину. Таким чином, було отримано 13 відгуків із використанням кожного потенціостату (рис. 3.24).

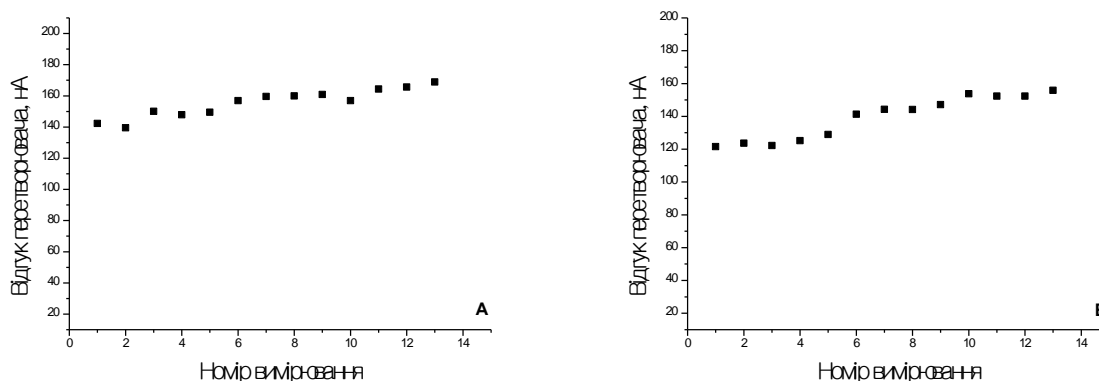


Рис. 3.24. Відтворюваність відгуків сенсорів на додавання перекису водню (0,5 мМ), отримані із використанням потенціостату українського виробництва (А) та Palm Sens (Б), потенціал 0,8 В відносно внутрішнього електрода порівняння.

Як видно з рисунку, відтворюваність відгуків на перексид водню була майже однакова для обох потенціостатів (відносне стандартне відхилення відгуків складало 8% для потенціостату українського виробництва, 7% для PalmSens). В обох випадках спостерігалось збільшення відгуків сенсорів впродовж вимірювань, що можливо пов'язано із використанням внутрішнього електроду порівняння, який призводив до дрейфу прикладеного потенціалу; потенціостат українського виробництва демонстрував менший дрейф сигналу протягом тривалого часу.

3.5.5. Порівняння роботи двох потенціостатів при роботі з глюкозними біосенсорами

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 амперометричного біосенсора, підключеного по черзі до обох потенціостатів, наведені на рис. 3.25. Лінійний діапазон біосенсорного вимірювання глюкози складав 0,1 – 2 мМ при підключенні до потенціостату українського виробника та 0,05 – 2 мМ для потенціостату фірми PalmSens. Форма калібрувальних кривих була ідентичною, що свідчило про відносну незалежність характеристик біосенсора від підключеного потенціостату.

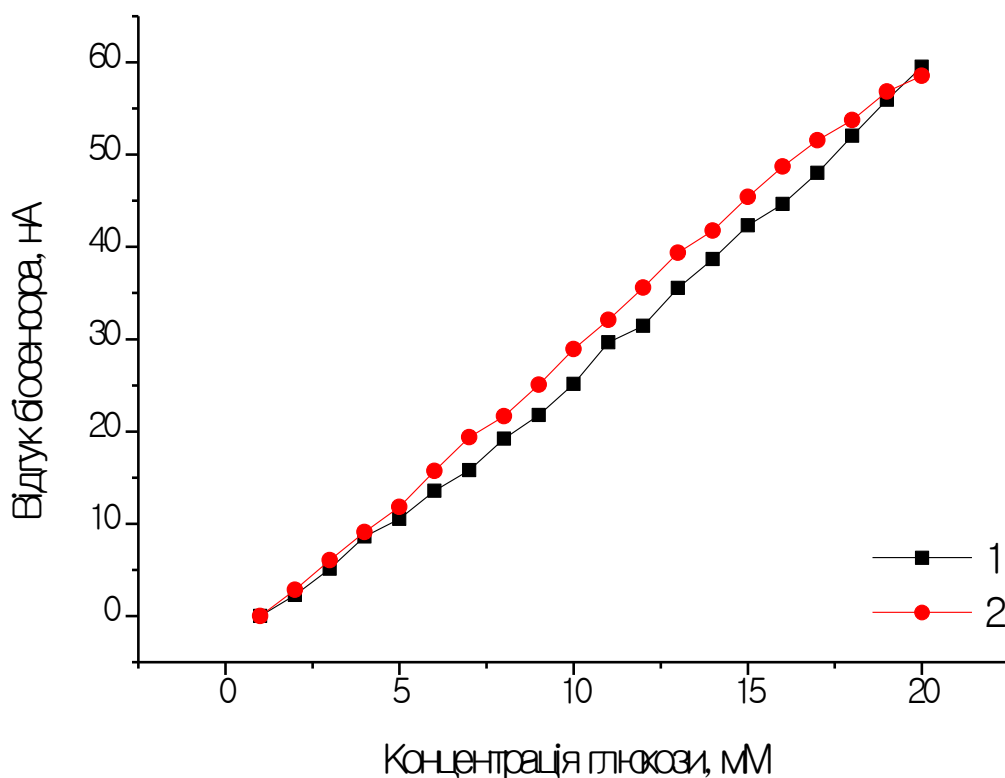


Рис. 3.25. Типові калібрувальні криві різних біосенсорів для визначення глюкози, отримані при використанні потенціостату українського виробництва (1) та PalmSens (2).

Також, було досліджено відтворюваність відгуків біосенсорів на глюкозу впродовж декількох годин безперервної роботи. Експеримент був такий самим як і при дослідженні відтворюваності відгуків на пероксид водню, тільки в якості субстрату виступала глюкоза.

Результати дослідження відтворюваності відгуків біосенсорів на глюкозу представлені на рис. 3.26.

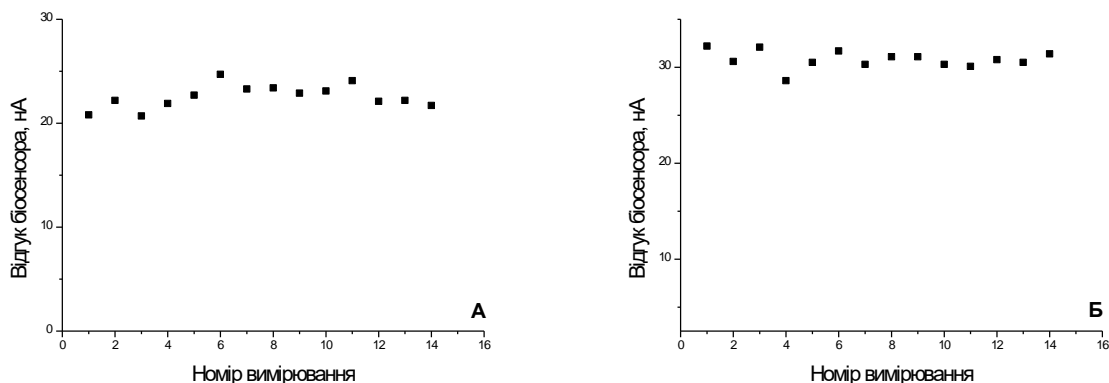


Рис. 3.26. Відтворюваність відгуків біосенсорів на додавання глюкози (0,5 мМ), отримані із використанням потенціостату українського виробництва (А) та PalmSens (Б).

Як можна бачити з рисунку, значного падіння відгуків за 15 вимірювань не відбувалось, що говорить про хорошу іммобілізацію ГОД у складі біоселективного елементу. Відтворюваність відгуків була різною для обох потенціостатів: відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на глюкозу складало 4,4 % у випадку PalmSens і 7,9 % у випадку потенціостату українського виробництва.

3.5.6. Підсумки

В роботі було проведено порівняння роботи двох потенціостатів при вимірюванні пероксиду водню та глюкози. Аналітичні характеристики сенсорів при роботі з обома потенціостатами у більшості випадків були майже однаковими. Потенціостат українського виробництва поступався потенціостату PalmSens за такими параметрами як: шум сигналу, межа визначення речовин, та похибка вимірювання.

За результатами усіх експериментів було складено таблицю порівняння, в яку увійшли аналітичні характеристики систем вимірювання вмісту

пероксиду водню та глюкози із використанням потенціостатів обох виробників (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

Порівняння характеристик амперометричних (біо)сенсорів, які базувались на нікелевих перетворювачах та потенціостатах українського виробництва та PalmSens

Параметри сенсорів	PalmSens	Потенціостат українського виробництва
Величина відгуку на 0,5 мМ Н ₂ О ₂ , нА	121,4	101,4
Шум базової лінії чистого сенсора, нА	0,5	1,3
Межа визначення Н ₂ О ₂ , мкМ	6,2	19,2
Час відгуку на Н ₂ О ₂ , хв.	< 1 хв	< 1 хв
Похибка вимірювання Н ₂ О 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.	100000 грн	15000 грн

Як видно з таблиці, в більшості випадків характеристики обох потенціостатів відрізнялися незначно; потенціостат українського виробництва поступався PalmSens за рівнем шуму сигналу та межі визначення речовин. Загалом, потенціостат українського виробництва може використовуватись для виготовлення амперометричних сенсорів та

біосенсорів, як дешевший аналог закордонних потенціостатів, в разі, коли немає необхідності у вимірюванні дуже низьких концентрацій речовин.

3.6. Порівняльний аналіз функціонування різних установок для кондуктометричних вимірювань при роботі з біосенсорами

3.6.1. Вступ

Для проведення порівняльного аналізу функціонування різних установок для кондуктометричних вимірювань, вибрали найбільш відомий та вивчений біосенсор на основі ГОД для визначення глюкози. З метою створення біосенсорів для визначення глюкози, використовуючи описану методику тестування кондуктометричних перетворювачів (див. підрозділ 3.4.), з них були відібрані перетворювачі, найбільш чутливі до зміни концентрації хлориду калію, та ті, що характеризувались найвищою диференційною здатністю. За описаною у розділі «Матеріали і методи» методикою нанесення біоселективних мембран на перетворювачі, були створені кондуктометричні біосенсори на основі ГОД для визначення глюкози. Їх роботу перевіряли впродовж одного робочого дня на трьох різних установках для кондуктометричних вимірювань: на стаціонарній установці на основі нановольметра «Unipan-233» (СУНУ), на експериментальній установці на основі портативного аналізатора «MCP-3» (ЕУПА) та багатофункціональній електрохімічній системі VoltaLab (БЕСВ) (принципи функціонування кожної з використаних в роботі установок див. в розділі «Матеріали і методи»).

3.6.2. Калібрувальні криві кондуктометричних біосенсорів, отримані з використанням різних вимірювальних установок

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. 3.27).

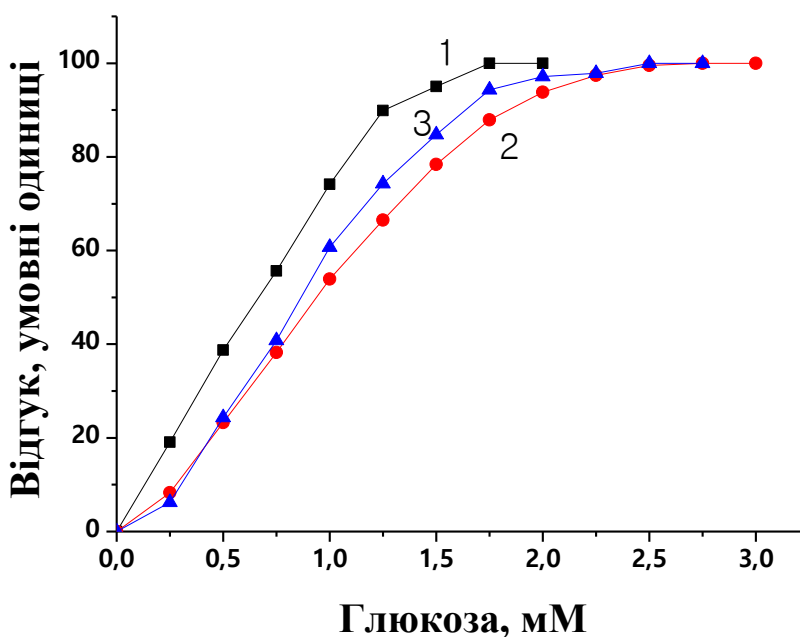


Рис. 3.27. Графік залежності відгуків біосенсора від концентрації глюкози, під час роботи на СУНУ (1), ЕУПА (2) та БЕСВ (3).

З рис. 3.27 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).

3.6.3. Дослідження відтворюваності та селективності сигналів біосенсорів, отриманих на різних установках для кондуктометричних вимірювань

При дослідженні відтворюваності роботи біосенсора впродовж робочого дня вимірювали відгуки на повторне внесення однієї й тієї ж самої концентрації глюкози (0,3 мМ) до вимірювальних комірок трьох різних установок для кондуктометричних вимірювань (рис. 3.28).

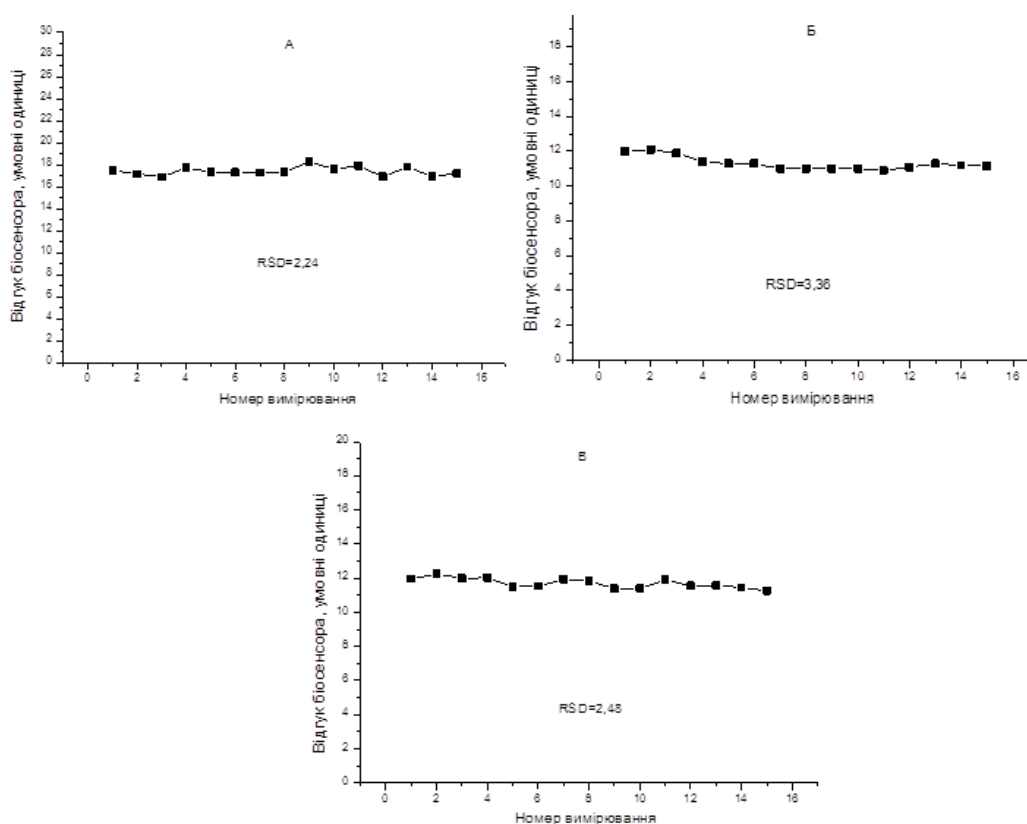


Рис. 3.28. Відтворюваність відгуків біосенсорів на додавання глюкози (0,3 мМ), отримані на різних установках для кондуктометричних вимірювань: СУНУ (А), ЕУПА (Б) та БЕСВ (В).

Крім того було показано, що біосенсор був селективним до глюкози при роботі на всіх установках, і не реагував на низку інтерферентів, таких як: фруктоза, арабіноза, лактоза, мальтоза, галактоза та маноза.

3.6.4. Підсумки

В роботі було проведено порівняльний аналіз роботи трьох різних вимірювальних установок для аналізу глюкози за допомогою кондуктометричного біосенсора на основі іммобілізованої ГОД. Аналітичні характеристики біосенсора, отримані на різних установках, зазвичай були майже однаковими. Узагальнені дані наведені в табл. 3.5.

Таблиця 3.5

Аналітичних характеристики біосенсора одержані на різних приладах

Показник	Вимірювання на приладі		
	СУНУ	ЕУПА	БЕСВ
Лінійний діапазон визначення, мМ	0 – 1,25	0 – 1,5	0 – 1,25
Мінімальна концентрація визначення, мМ	0,01	0,005	0,001
Відтворюваність (SD, %)	2,24	3,36	2,48
Селективність (відгук на 0,5 мМ, %):			
-глюкоза	100	100	100
-фруктоза	—	—	—
-арабіноза	—	—	—
-лактоза	—	—	—
-мальтоза	—	—	—
-галактоза	—	—	—
-маноза	—	—	—

Показано, що отримані біосенсори можуть успішно функціонувати у складі трьох різних установок для кондуктометричних вимірювань. Головним показником була мінімальна границя визначення глюкози, яка вираховувалась із співвідношення корисний сигнал/шум, оскільки сигнали

біосенсора, отримані на різних установках, були практично однаковими, але при дуже різних шумах базової лінії.

3.7. Висновки до розділу 3

Під час виконання роботи обґрунтовано та запропоновано нові універсальні методики тестування електрохімічних перетворювачів, які здатні забезпечити нескладний і швидкий відбір оптимальних за своїми характеристиками перетворювачів для використання в подальшій розробці біосенсорів. В ході тестування датчиків було досліджено їхні основні аналітичні характеристики для відповідного типу перетворювача. Для кондуктометричних перетворювачів важливими параметрами, які необхідно досліджувати, є чутливість перетворювача, ідентичність його каналів, співвідношення шум/сигнал. Для амперометричних перетворювачів було досліджено чутливість до перекису водню, вибрано оптимальний потенціал роботи, досліджено відтворюваність сигналу та селективність відносно електроактивних речовин. Було показано, що з використанням додаткової напівпроникної полімерної плівки полі-мета-фенілендіаміну на поверхні амперометричного перетворювача, можна отримати виражену селективність сенсора до перекису водню.

В роботі також проведено порівняльний аналіз та визначено переваги відповідних приладів та схем вимірювання при роботі з ферментними біосенсорами. За результатами перевірки обґрунтовано та запропоновано методики вибору методів вимірювання в залежності від поставлених завдань під час розробки біосенсорів.

Запропоновані методики дозволять зберегти час, суттєво полегшать та систематизують процедуру попередньої перевірки амперометричних

перетворювачів та попереднього вибору вимірювальної установки при розробці ферментних електрохімічних біосенсорів.

Результати цього розділу опубліковано в працях:

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.

РОЗДІЛ 4

РОЗРОБКА МУЛЬТИФЕРМЕНТНИХ БІОСЕНСОРІВ

4.1. Біосенсори на основі каскадів ферментативних реакцій для прямого визначення субстратів

На даний момент серед мультиферментних біосенсорів найбільш розповсюдженими є сенсори на основі каскадів ферментативних реакцій, в результаті яких, субстрат поступово перетворюється до електроактивного продукту, який можна буде зареєструвати електрохімічними перетворювачами напряду або з використанням медіаторів. Тому даний підрозділ буде присв'ячено саме науковому обґрунтуванню, дослідженню та аналізу низки варіантів мультиферментних біосенсорів на основі різноманітних каскадів ферментативних реакцій. Схематичний вигляд усіх каскадів ферментативних реакцій що були використані для розробки мультиферментних біосенсорів даного типу приведено в додатку Б.

4.1.1. Біосенсор на основі трьох ферментів для визначення лактози

4.1.1.1. Вступ

Унікальні властивості лактози обумовлюють її широке застосування в мікробіології, харчовій промисловості, фармакології тощо. В наш час лактозу інтенсивно використовують при виробництві дитячого харчування та

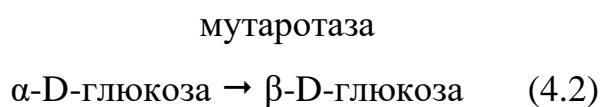
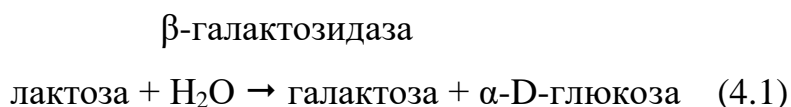
замінників материнського молока. Також широкого застосування лактоза набула при виробництві медичних препаратів, антибіотиків та харчових продуктів.

В нормі, у складі коров'ячого молока, міститься, як правило, від 4,4 до 5,2% лактози. Швидке та точне визначення лактози є дуже важливим у процесі контролю ферментації молочної сироватки. Окрім того, вміст лактози є основним показником при оцінці якості молока. Існують дані, що молоко корів, які страждають маститом, містить знижений рівень лактози [228].

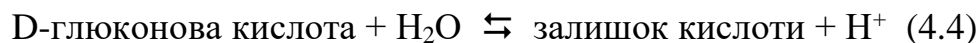
Крім того, існує специфічне захворювання, яке називається непереносимістю лактози, викликане повним або частковим дефіцитом ферменту β -галактозидази в травній системі людини [229]. Хворі на непереносимість лактози, через здатність організму перетравлювати лактозу з молока, мають притримуватися певної безлактозної дієти [230]. Крім того, контроль рівня лактози необхідний при виробництві безлактозного молока. Отже, наявність швидкого і недорогого методу визначення лактози має велике значення для молочної промисловості [231].

4.1.1.2. Принцип роботи лактозного біосенсора

Біоселективна мембрана розробленого в роботі лактозного кондуктометричного біосенсора містить три іммобілізовані ферменти, такі як β -галактозидаза, мутаротаза та ГОД, а в основі роботи такого кондуктометричного біосенсора лежить наступний каскад ферментативних реакцій:



ГОД



β -галактозидаза, мутаротаза та ГОД поетапно розщеплюють лактозу до D-глюконолактону та пероксиду водню. Глюконолактон, в свою чергу, спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, що дисоціює на залишок кислоти і протон, при цьому змінюється провідність розчину, яку реєструють за допомогою кондуктометричного перетворювача [232]. На рис. 4.1 наведено типові відгуки кондуктометричного біосенсора на додавання у комірку глюкози та лактози. Відгук лактозного біосенсора на глюкозу є цілком зрозумілий, оскільки до складу ферментної мембрани лактозного біосенсора входить глюкозооксидаза.

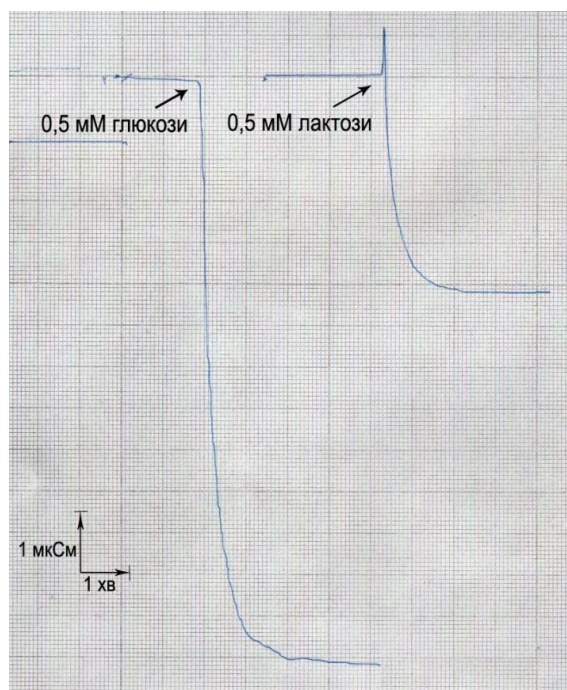


Рис. 4.1. Відгуки кондуктометричного біосенсора на додавання у комірку 0,5 мМ глюкози та 0,5 мМ лактози. Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0.

Оскільки лактозний сенсор дає відгук і на глюкозу і на лактозу, то для визначення лактози необхідним є наявність також глюкозного сенсора. У зв'язку з цим, вимірювання лактози в зразках необхідно проводити в два етапи. Спочатку визначають концентрацію глюкози в зразку глюкозним сенсором, а потім визначають сумарну концентрацію лактози і глюкози у досліджуваному розчині з використанням лактозного сенсора. Різниця цих концентрацій, визначених обома біосенсорами, відповідає концентрації лактози в розчині. В майбутньому, при використанні даного біосенсора в складі мультибіосенсорної системи, ми будемо мати можливість вимірювати ці величини одночасно.

На рис. 4.2 показано графіки залежності зміни провідності приелектродного шару лактозного біосенсора від концентрації глюкози (1) та лактози (2).

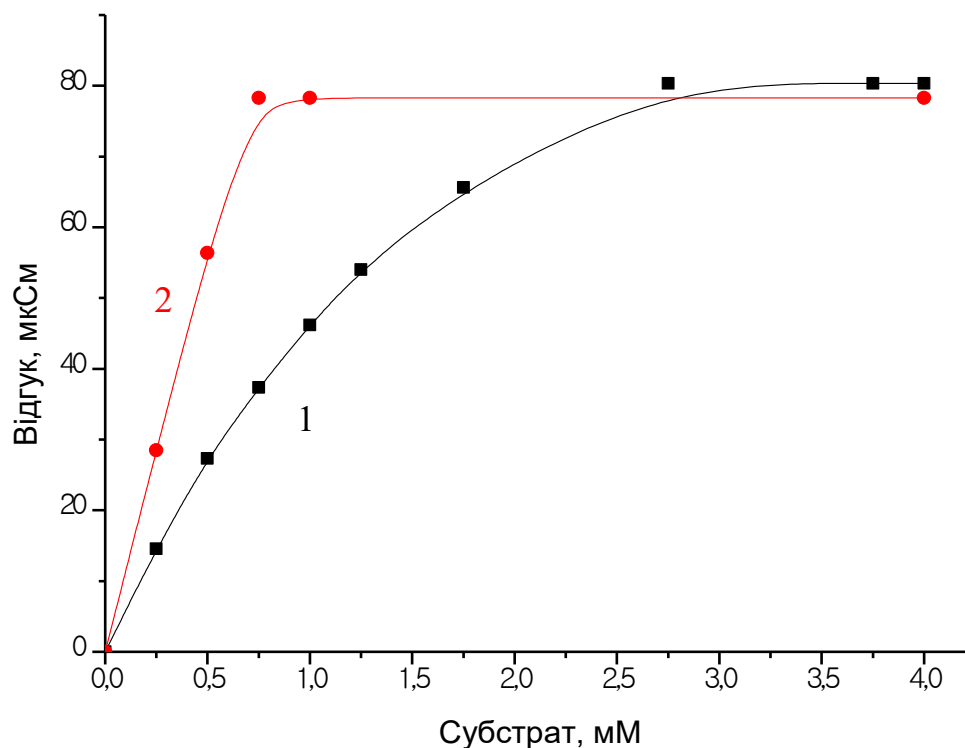


Рис. 4.2. Графіки залежності величин відгуків мультиферментного біосенсора від концентрації лактози (1) та глюкози (2). Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5.

Вимірювання проводились у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. З рисунку видно, що лінійний діапазон роботи біосенсора коливався в межах від 0 до 0,75 мМ для глюкози та до 1,25 мМ для лактози. Мінімальна концентрація, яку можна було визначати біосенсором, складала 0,01 мМ для глюкози та лактози.

4.1.1.3. Вплив параметрів розчину на роботу лактозного біосенсора

В основі кондуктометричного методу лежить вимірювання зміни провідності аналізованого розчину. Така зміна провідності залежить як від самої ферментативної реакції, так і від характеристик розчину, в якому ця реакція проходить. Тому, передусім, було досліджено вплив параметрів розчину (іонна сила, буферна ємність, рН) на величину відгуку розробленого сенсора.

На рис. 4.3. показано залежності величин відгуків біосенсора від концентрації лактози у буферному розчині різної концентрації. З рисунку видно, що при зміні концентрації буферного розчину змінюються величини відгуків біосенсора, а, відповідно, і чутливість біосенсора, та лінійний діапазон визначення. У випадку роботи кондуктометричного біосенсора при збільшенні концентрації фосфатного буферного розчину від 5 мМ до 30 мМ, чутливість біосенсора до лактози значно знижувалась, а лінійний діапазон визначення лактози в певній мірі зменшувався.

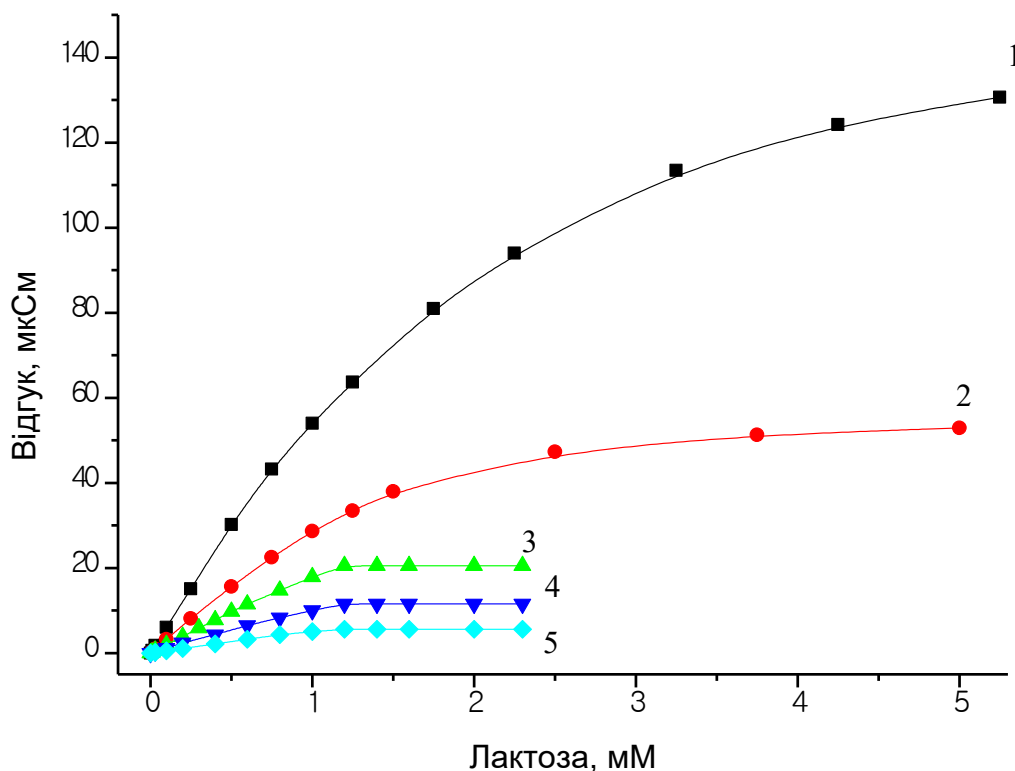


Рис. 4.3. Залежність величин відгуків біосенсора від концентрацій лактози у фосфатному буферному розчині рН 6,5 різної концентрації: 5 мМ (1), 10 мМ (2), 15 мМ (3), 20 мМ (4), 30 мМ (5).

На рис. 4.4 представлено залежності величин відгуків біосенсора на внесення 0,1 мМ глюкози та 0,1 мМ лактози від різних концентрацій фосфатного буферного розчину. Також представлено криву залежності співвідношень відгуків на 0,1 мМ глюкози та 0,1 мМ лактози від різних концентрацій буферного розчину. З графіку видно, що при збільшенні концентрації буферу, а, відповідно, і буферної ємності, співвідношення відгуків на 0,1 мМ глюкози та 0,1 мМ лактози є близьким одиниці, але в той же час, величини відгуків біосенсора на глюкозу та лактозу зменшуються. Зниження відгуків на субстрат при збільшенні концентрації буферного розчину пов'язане із зростанням фонові провідності та зростанням асоціації

протонів з буферними частками (збільшення буферної ємності розчину), що необхідно враховувати при проведенні аналізів.

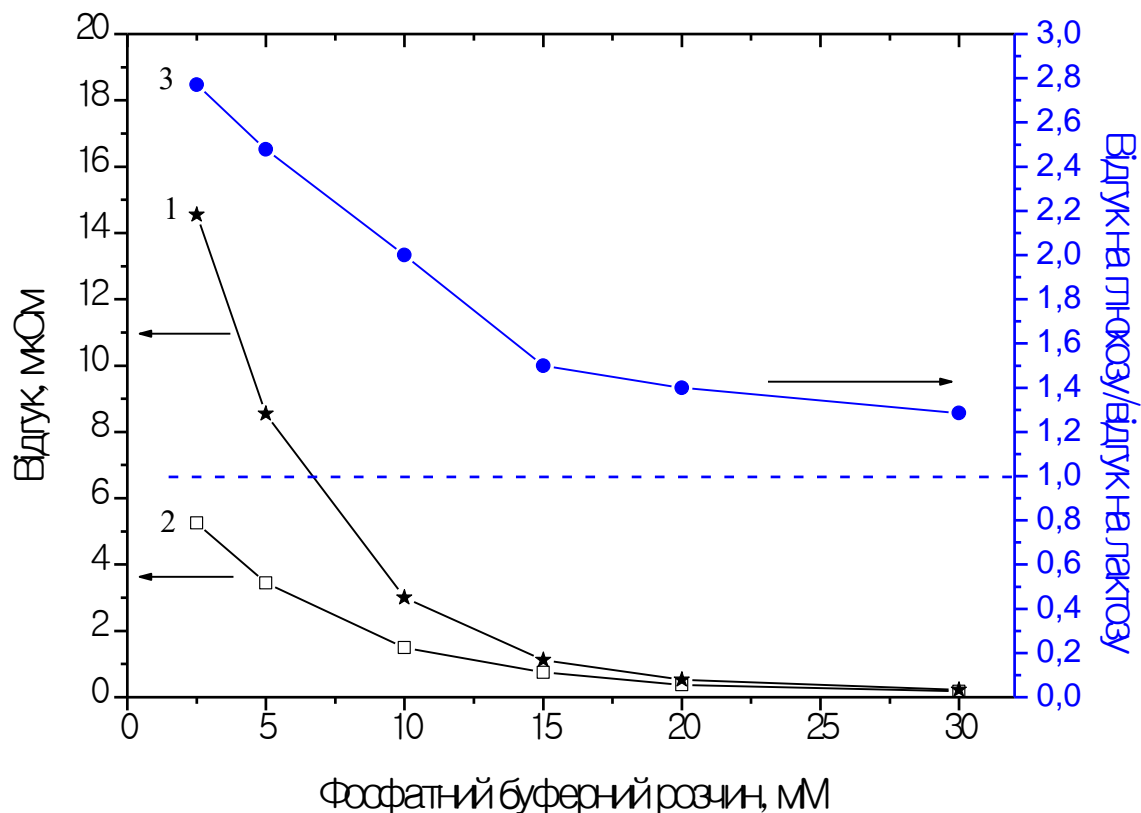


Рис. 4.4. Залежності величин відгуків біосенсора на 0,1 мМ глюкози (1) і 0,1 мМ лактози (2) та співвідношення відгуків біосенсора на 0,1 мМ глюкози та 0,1 мМ лактози (3) від буферних розчинів різної концентрації.

Однією з характеристик робочого буферного розчину, що негативно впливає на вимірювання з використанням кондуктометричних біосенсорів, є іонна сила розчину. Щоб дослідити цей вплив, було проведено вимірювання величини сигналу на 0,8 мМ лактози при роботі в розчинах за різної концентрації КСl (рис. 4.5). З графіка видно, що при збільшенні концентрації КСl (відповідно і іонної сили), зменшується за експонентою відгук на субстрат: спочатку спостерігається значне падіння величини відгуків

біосенсора, а при концентрації 20-50 мМ КСІ в робочому буферному розчині величина сигналу біосенсора на лактозу складає менше 1% від початкового відгуку, що було отримано без додавання КСІ у комірку. Одна з головних причин такої залежності - зростання фонові провідності розчину. Тому при проведенні вимірювань за допомогою кондуктометричного біосенсора дуже важливим є контроль іонної сили аналізованих зразків.

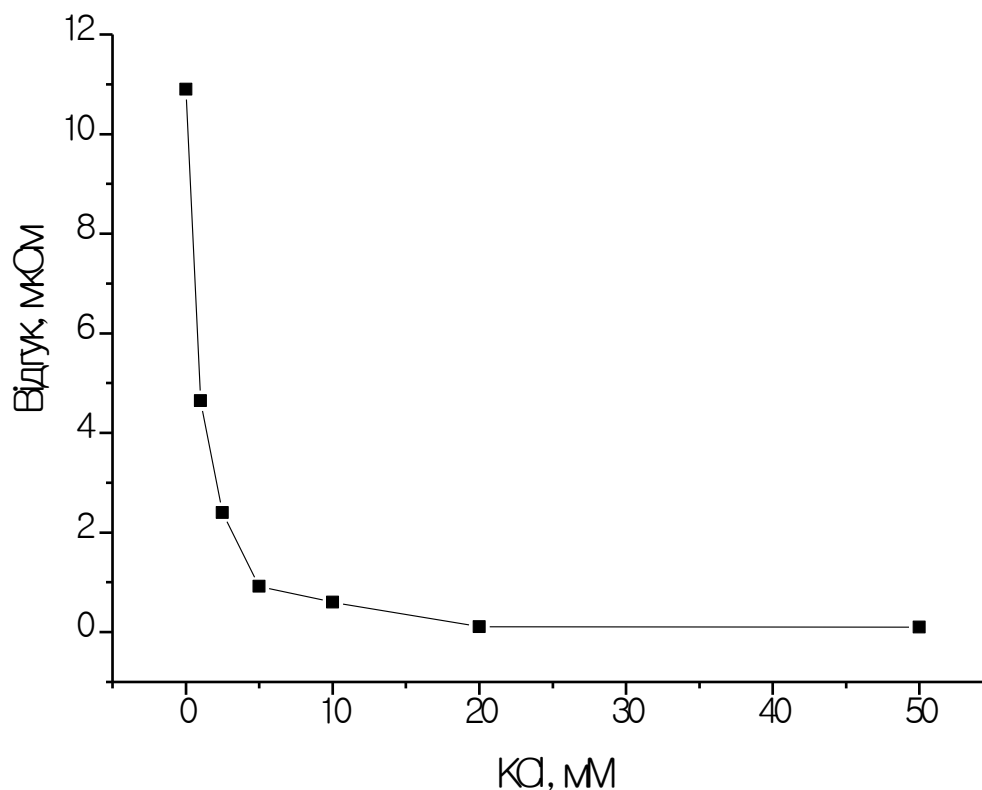


Рис. 4.5. Залежність величини відгуку кондуктометричного біосенсора для визначення лактози на внесення 0,8 мМ лактози від концентрації КСІ в 10 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5.

Відомо, що кожен фермент має рН оптимум своєї роботи. Деякі ферменти після їхньої іммобілізації можуть змінювати свій рН оптимум, здвигаючи його або в лужну, або ж в кислу області. У нашому випадку, ми маємо суміш трьох іммобілізованих на поверхню сенсора ферментів, з

різними рН оптимумами. Тому наступною задачею було встановити оптимальне значення рН буферного розчину, для роботи всіх ферментів у складі кондуктометричного біосенсора для визначення лактози.

Ми не використовували в даному експерименті традиційний універсальний буферний розчин, до складу якого входить боратний буферний розчин, оскільки в присутності солей бората лактоза ізомеризується в лактулозу, що в свою чергу, призводить до зниження сигналу на внесення лактози приблизно вдвічі [97]. Оскільки активність роботи лактозного біосенсора в фосфатному буферному розчині вищаніж в ацетатному [67], ми проводили виміри в фосфатному буферному розчині з різним значенням рН (від 5,0 до 8,0).

Графіки залежності величини сигналу на внесення 0,5 мМ лактози та 0,5 мМ глюкози від рН середовища мали колоколоподібну форму з максимумом при рН 6,5 та рН 5,5 відповідно (рис. 4.6). Оскільки ми займалися розробкою мультиферментного біосенсора для визначення саме лактози, а перевіряли чутливість біосенсора до глюкози лише для контролю, то в подальшому було вирішено використовувати для роботи рН буферного розчину 6,5.

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших дослідників. Наприклад, в статті [96] було показано, що найвищі відгуки лактозного біосенсора були отримані в діапазоні рН 6,0-6,2 фосфатного буферного розчину. У роботі [67], автори повідомляють про те, що рН оптимум роботи їхнього лактозного сенсора в фосфатному буферному розчині дорівнював 6,5. рН оптимум роботи біосенсора та його активність може змінюватися залежно від умов іммобілізації та типу буферного розчину. В даному випадку оптимальним значенням рН фосфатного буферного розчину для роботи біосенсора є 6,5. Це пов'язано з тим, що ферменти β -ГАЛ та МУТ мають оптимум роботи при рН 7,5, а ГОД при рН 5,5, тому оптимальне значення рН

для одночасної роботи трьох ферментів дорівнює середньому значенню рН оптимумів всіх трьох ферментів.

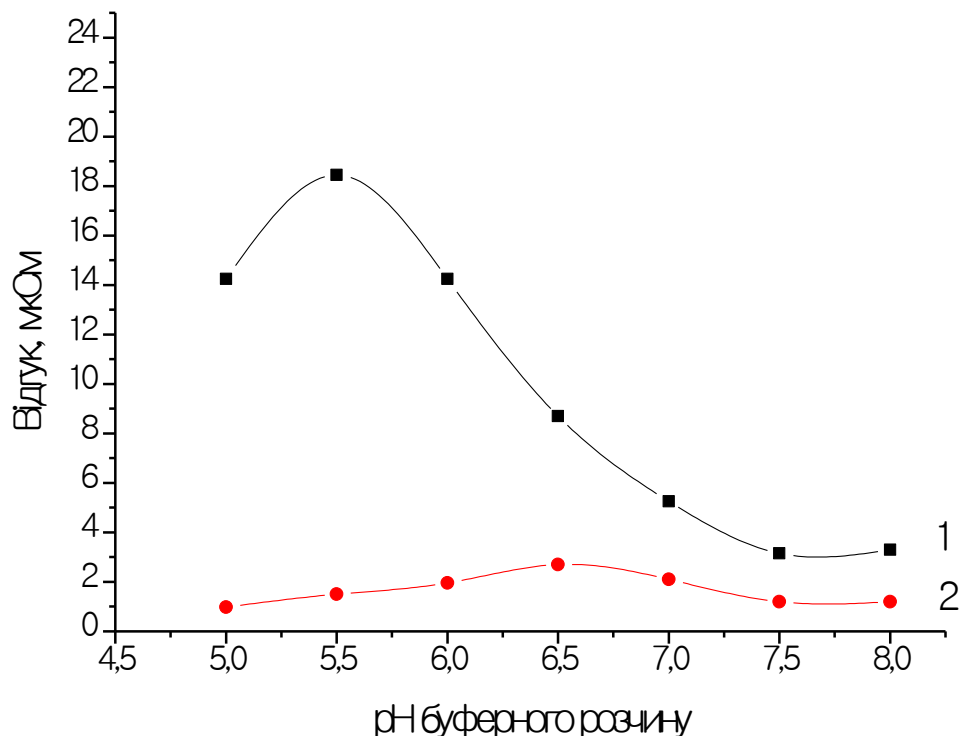


Рис. 4.6. Графік залежності відгуків лактозного біосенсора від рН розчину при внесенні 0,5 мМ глюкози (1) та 0,5 мМ лактози (2). Вимірювання проводили у 10 мМ фосфатному буферному розчині.

4.1.1.4. Дослідження операційної стабільності та відтворюваності сигналу лактозного біосенсора

Однією з найбільш важливих характеристик біосенсорів є їх операційна стабільність та відтворюваність. Для дослідження відтворюваності, 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 при постійному

перемішуванні. Обрана для досліджень концентрація лактози (0,15 мМ) знаходилася на лінійному відрізку калібрувальної кривої біосенсора. З рис. 4.7. видно, що сенсор характеризувався високою відтворюваністю сигналів (RSD=3,84).

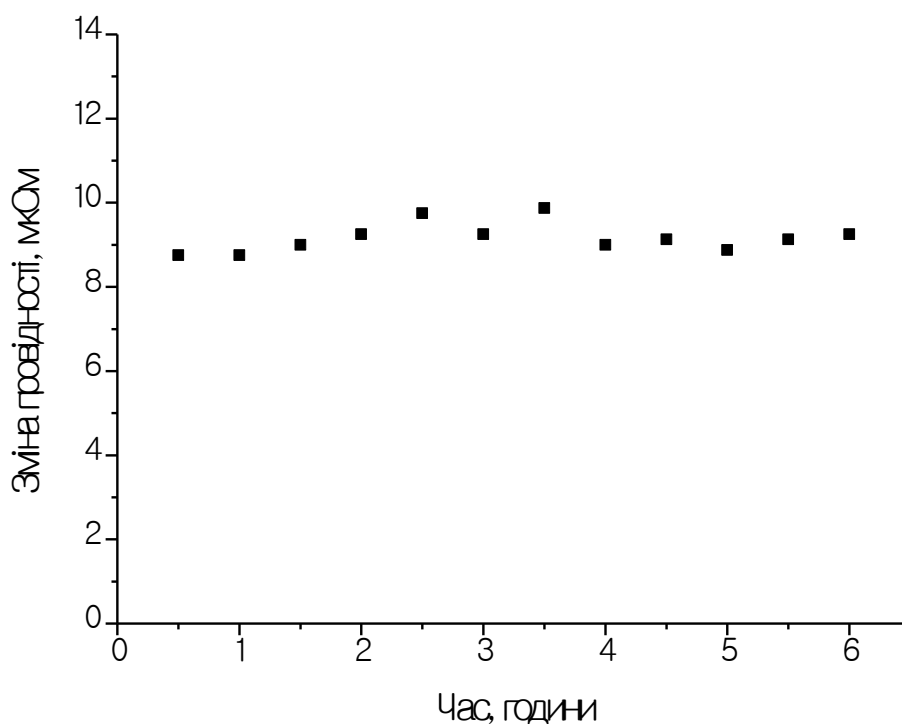


Рис. 4.7. Відтворюваність сигналів біосенсора для визначення лактози. Вимірювання проводилися в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. Концентрація лактози - 0,15 мМ.

4.1.1.5. Дослідження стабільності сигналу лактозного біосенсора при зберіганні

З метою можливої подальшої комерціалізації розробленого біосенсора, було проведено ряд дослідів по вивченню стабільності біосенсорів для визначення лактози при їх зберіганні (рис. 4.8). Біосенсори зберігали при температурі +4°C в сухих умовах. У перший день після створення лактозних

біосенсорів було отримано відгук на внесення 0,15 мМ лактози, величина якого була прийнята за 100%. Подальші вимірювання проводились через деякий проміжок часу (3-8 днів). Слід зазначити, що відгук біосенсора зменшився лише на 22% протягом трьох місяців, що є досить високим показником.

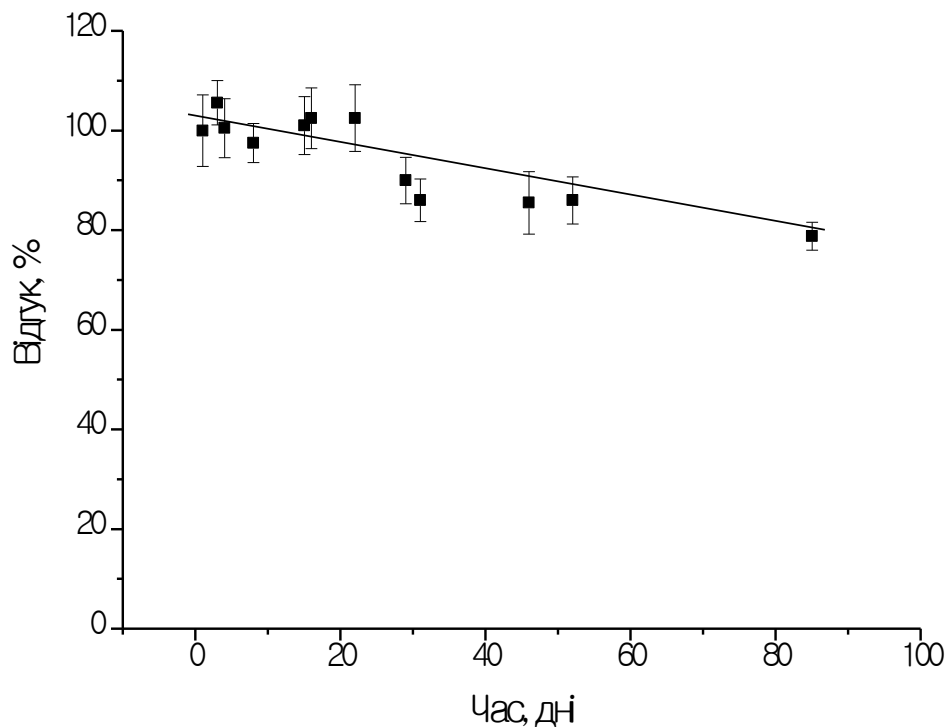


Рис. 4.8. Стабільність біосенсора для визначення лактози під час зберігання його в сухих умовах при температурі +4°C. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. Концентрація лактози - 0,15 мМ.

4.1.1.6. Аналіз селективності роботи лактозного біосенсора

Для проведення в подальшому робіт з реальними зразками необхідно було також провести перевірку селективності запропонованого лактозного

біосенсора. Тому було проведено ряд досліджень щодо впливу інтерферуючих компонентів на відгук лактозного біосенсора. Дослідження проводились в 10 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5, у експериментальну комірку з біосенсором вносили 0,5 мМ концентрації можливої інтерферуючої речовини (табл. 4.1). Відгук сенсора розраховувався у процентах, 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 та мальтози. Відгук лактозного біосенсора на глюкозу є зрозумілий, оскільки до складу ферментної мембрани лактозного біосенсора входить фермент глюкозооксидаза. Тому для визначення лактози в зразках, в яких може бути присутня глюкоза, необхідним є наявність другого біосенсора, чутливого тільки до глюкози.

Відгук кондуктометричного лактозного біосенсора на 0,5 мМ мальтози становить 8% від відгуку на ту ж саму концентрацію лактози. Оскільки в подальшому планується використовувати лактозний сенсор в основному для визначення лактози в молочно-кислих продуктах, в яких відсутня мальтоза, то ця чутливість сенсора по відношенню до мальтози не впливатиме на точність аналізу

Таблиця 4.1

Селективність біосенсора для визначення лактози

1мМ субстанції	Відносний відгук біосенсора (%)
Лактоза	100,0
Глюкоза	172,5
Мальтоза	8,0
Сахароза	0
Фруктоза	0

Арабіноза	0
Манноза	0

4.1.1.7. Підсумки

Обґрунтовано та розроблено кондуктометричний біосенсор для визначення лактози, в якому триферментна (β -галактозидаза, мутаротаза та ГОД) біоселективна мембрана відіграє роль чутливого елемента, та досліджено його аналітичні характеристики при роботі з модельними зразками (залежність відгуку від рН, йонної сили і буферної ємності робочого розчину).

Запропонований біосенсор характеризується гарною відтворюваністю сигналу ($RSD=3,84$) та стабільністю при зберіганні (78% відгуку після 3 місяців зберігання). У подальшому розроблений біосенсор може з успіхом використовуватись для визначення лактози в реальних зразках (наприклад, кисломолочні продукти).

4.1.2. Біферментний біосенсор для визначення аргініну

4.1.2.1. Вступ

L-Аргінін (δ -гуанідин- α -аміновалеріанова кислота) – це умовно незамінна амінокислота, що є попередником у біосинтезі багатьох біологічно активних сполук [233]. Для організму людини аргінін є напівнезамінною амінокислотою, тобто біохімічні шляхи для її біосинтезу існують, але в певні періоди життя: інтенсивного росту, розвитку, а також при деяких захворюваннях, вони не забезпечують організм достатньою кількістю цієї амінокислоти. Тому вона обов'язково повинна потрапляти в організм із їжею [233].

Аргінін входить до складу білків, ця амінокислота також важлива для використання в інших метаболічних шляхах клітини, наприклад, для синтезу нітроген (II) оксиду (NO), поліамінів, проліну, глутамату, креатину, агматину та орнітину [234]. Близько 60% спожитої амінокислоти метаболізується в шлунково-кишковому тракті, і лише 40% потрапляє у кров в незмінному стані [235]. Необхідно насичувати тканини організму цією амінокислотою, тому в щоденний раціон харчування слід включати продукти, що містять максимальну кількість аргініну [236]. Окрім харчових продуктів концентрацію аргініну в крові можливо збільшувати за рахунок прийому певних фармацевтичних препаратів.

На сьогодні виробники лікарських засобів пропонують низку препаратів на основі амінокислоти аргінін. Вони застосовуються для профілактики перетомі, цукрового діабету, безпліддя, депресії, а також при астеничних станах, захворюваннях нирок, артритів та артрозах, серцево-судинних захворюваннях та при наявності новоутворень. На жаль, при виробництві цих препаратів може здійснюватися неналежний контроль концентрації аргініну в їхньому складі. Окрім того, на фармацевтичному ринку часто з'являються фальсифіковані препарати.

Відповідно, досить важливим завданням є розробка пристрою, який би давав змогу експресно визначати концентрацію аргініну у складі фармацевтичних препаратів. Саме таким пристроєм може бути кондуктометричний біосенсор на основі двох ферментів: аргінази та уреазі.

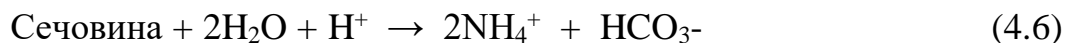
4.1.2.2. Принцип роботи аргінінового біосенсора

В основі роботи аргінінового біосенсора лежать каскад ферментативних реакцій, що відбуваються в біоселективній мембрані кондуктометричного біосенсора для визначення аргініну:

Аргіназа



Уреаза



В процесі проходження ферментативної реакції аргіназа розщеплює L-аргінін на сечовину та L-орнітин. Але продукти цієї реакції не є придатними для кондуктометричного аналізу. Тому був використаний додатковий фермент уреаза, який розщеплює сечовину на дві молекули аміаку та одну молекулу CO₂, які у водному середовищі перетворюються в позитивно заряджений амоній та залишок вуглецевої кислоти, при цьому різко збільшується концентрація іонів в біоселективній мембрані. Це призводить до зміни провідності розчину, яку реєструють кондуктометричним перетворювачем.

4.1.2.3. Визначення оптимального методу іммобілізації уреази при розробці біосенсорів для визначення аргініну

Для вибору оптимального методу іммобілізації, при розробці біосенсора для визначення аргініну, необхідно було перевірити перспективність різних традиційних методів іммобілізації, що використовуються в біосенсориці. При розробці біосенсора для визначення аргініну використовується два фермента аргіназа та уреаза. Але, оскільки саме уреаза в більшій мірі відповідає за кінцеву зміну провідності, яку буде реєструвати кондуктометричний перетворювач, необхідно забезпечити оптимальну роботу саме цього ферменту. Для порівняння застосовувалися

методики іммобілізації урези поперечною зшивкою глутаровим альдегідом (з використанням ГА в парах та краплі), адсорбція на нітроцелюлозі і силікаліті, та фотополімеризація в PVA/SbQ. Для порівняння, у всіх методах іммобілізації було використано одну й ту саму кількість ферменту із розрахунку на один біосенсор.

За результатами досліджень для кожного уреазного біосенсора, створеного на основі різних методик іммобілізації, побудовано калібрувальні графіки для наглядного порівняння результатів (рис. 4.9). Величини таких важливих аналітичних характеристик біосенсора, як чутливість, мінімальна границя визначення, лінійний діапазон роботи, шум та дрейф базової лінії, наведено в табл. 4.2 для усіх варіантів іммобілізації.

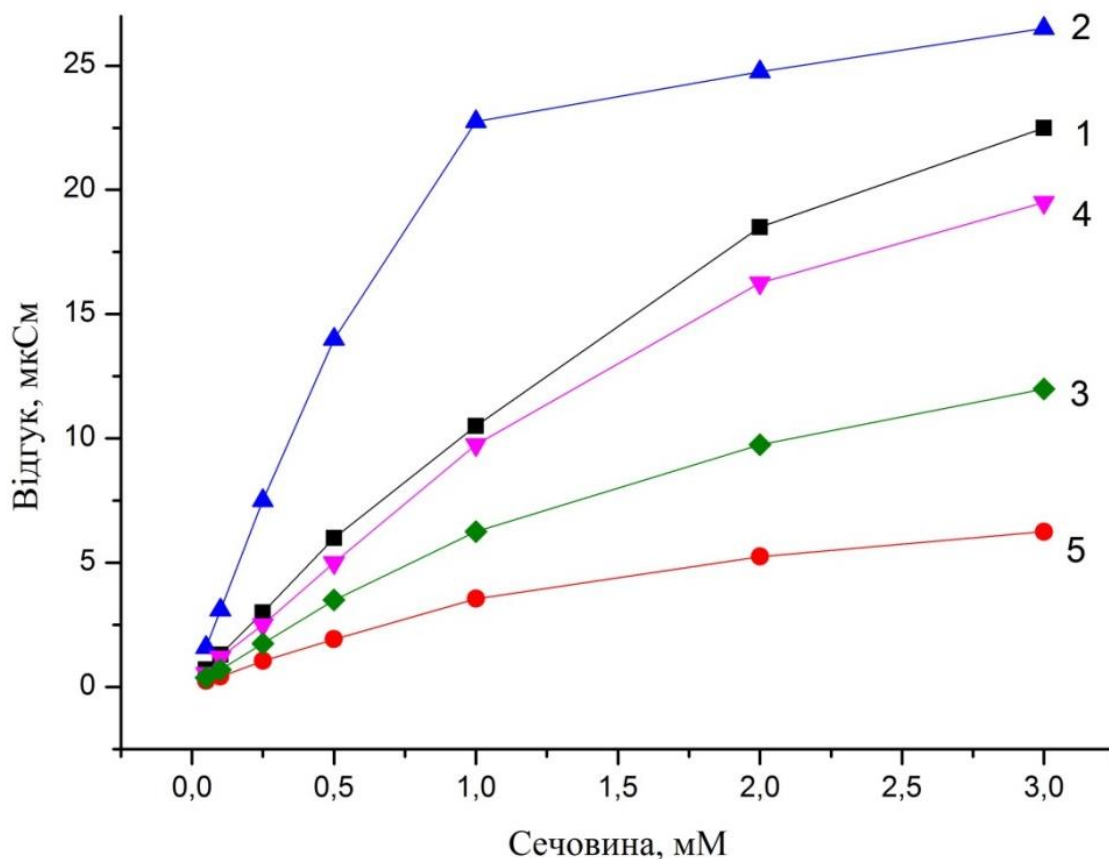


Рис. 4.9. Калібрувальні криві біосенсорів, виготовлених на основі різних методів іммобілізації урези: в парах (1) та краплі (2) глутарового альдегіду, адсорбції на нітроцелюлозі (3) і силікаліті (4), та фотополімеризації

в PVA/SbQ (5). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4.

Біосенсори на основі адсорбції уреазі на силікаліті та іммобілізації в парах ГА характеризувались найкращим лінійним діапазоном роботи. Але, наприклад, практичне використання методу адсорбції на силікаліті при двошаровому нанесенні уреазі та аргінази є малоімовірним. З іншого боку, біосенсори виготовлені на основі іммобілізації уреазі в краплі глутарового альдегіду були більш чутливими з нижчу мінімальною границею визначення сечовини. Тому у подальшому, при розробці двоферментного біосенсору для визначення аргініну, використання саме цього методу іммобілізації було найбільш зручним.

Таблиця 4.2

Порівняння аналітичних характеристик біосенсорів на основі різних методів іммобілізації

Тип іммобілізації	Чутливість (мкСм/мМ)	Мін. границя визначення (мМ)	Верхня границя лінійного діапазону роботи, (мМ)	Дрейф, (мкСм /хв)	Шум, (мкСм)	Особливості процедури іммобілізації
В парах ГА	12,3±6,9	0,02	до 2	0,15	0,825	Токсичність випарів ГА
В краплі ГА	23,4±3,4	0,001	до 0.5	0,084	0,079	Зручність проведення
На нітроцелюлозі	2,7±1,5	0,062	до 1	0,25	0,564	Малоефективне зв'язування
На силікаліті	8±5,6	0,007	до 2	0,047	0,199	Багатоетапність іммобілізації
В PVA/SbQ	6,2±3,7	0,009	до 1	0,074	0,194	Світлочутливість фотополімеру

4.1.2.4. Оптимізація основних параметрів процесу іммобілізації аргінази та уреазу у БСА мембрані в краплі глутарового альдегіду

В першій частині фрагменту цієї роботи було обрано метод іммобілізації в краплі ГА, який використовувався при розробці біосенсора для визначення аргініну на основі двох ферментів (аргіназа та уреазу). Відповідно, наступним етапом є оптимізація основних параметрів обраного методу іммобілізації для створення двоферментного біосенсора для визначення аргініну. Для оптимізації методики іммобілізації слід підібрати концентрації обох ферментів, що входять до складу біосенсора, концентрацію ГА, час інкубації та послідовність процедури іммобілізації, за яких біосенсори проявляють найкращі характеристики.

Для визначення найбільш ефективної концентрації уреазу в складі біоселективного елемента, при якій спостерігаються максимальні сигнали біосенсора, було проведено дослідження залежності відгуків біосенсора від концентрацій уреазу (0,25%; 0,5%; 1%; 3%; 5%). Результати експерименту приведено на рис. 4.10. Отримані результати свідчать, що при зміні концентрацій ферменту від 0,25 % до 0,5% відгуки біосенсора зростають в кілька разів, а при подальшому збільшенні до 5 % ферменту в мембрані, відгуки збільшуються повільніше. Найбільші сигнали біосенсорів отримано при концентрації уреазу 5%.

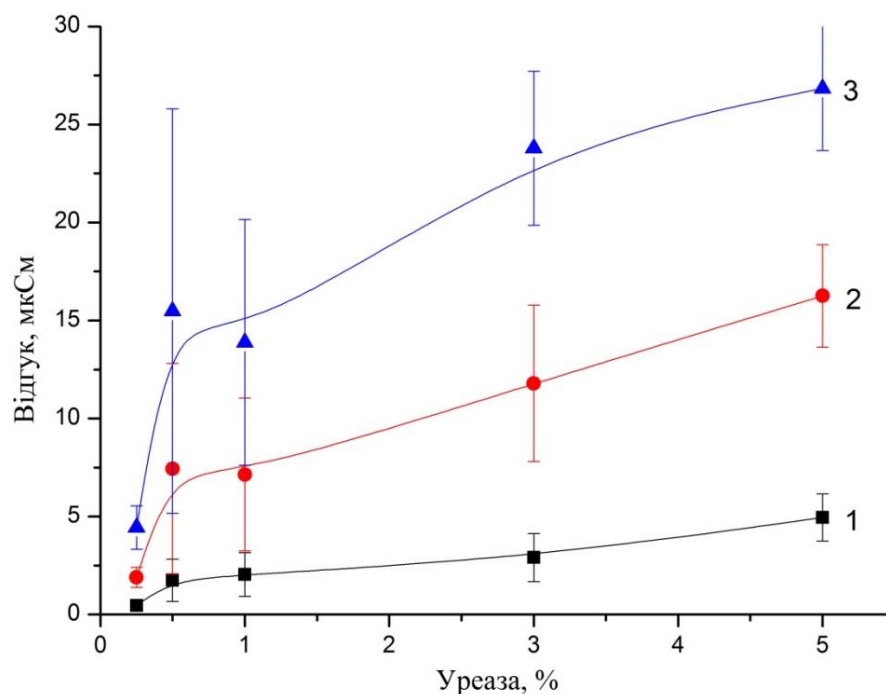


Рис. 4.10. Графік залежності величини відгуків біосенсорів від концентрації уреазу в складі біоселективної мембрани за різних концентрацій сечовини: 0,2 мМ (1), 1 мМ (2), 4 мМ (3). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4.

Для визначення оптимальної концентрації аргінази у складі біоселективного елементу двоферментного біосенсора, було перевірено відгуки біосенсорів на різні концентрації аргініну, при різних концентраціях аргінази у біоселективній мембрані (1,5%; 2,5%; 3%; 5%; 6,6%; 7,5%), при постійній концентрації уреазу 5%. Згідно отриманих результатів (рис. 4.11), максимальні відгуки біосенсорів на основі двох ферментів спостерігаються при концентрації аргінази у складі біосенсора - 5%. Саме таку концентрацію ферменту використовували в подальших експериментах.

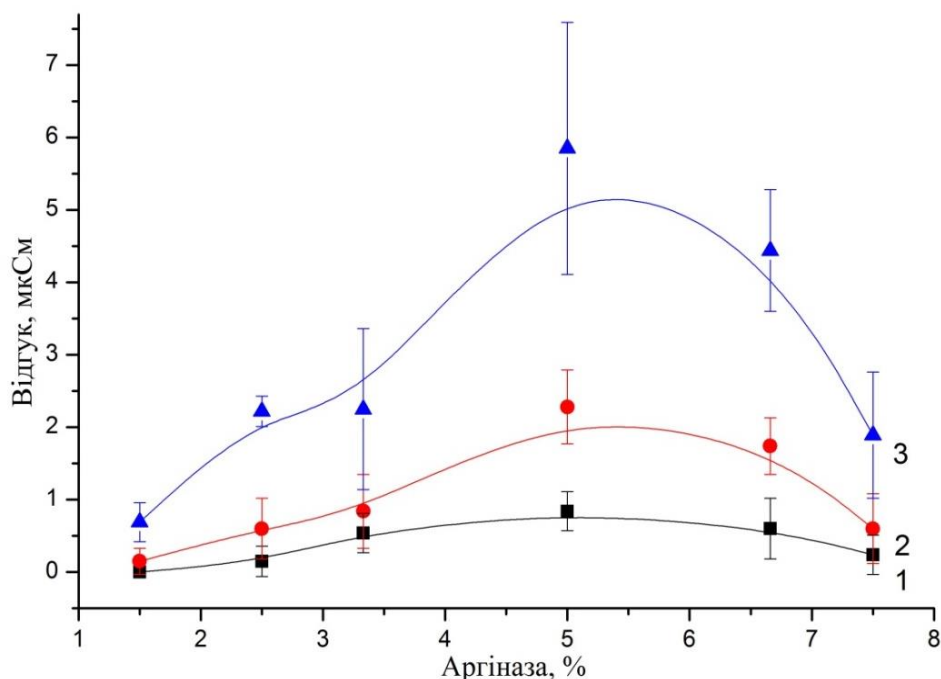


Рис. 4.11. Графік залежності величини відгуків біосенсорів від концентрації аргінази у біологічних мембранах при різних концентраціях аргініну: 0,025 мМ (1), 0,1 мМ (2), 0,75 мМ (3). Концентрація уреазу у складі мембрани – 5 %. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН=7,4.

На наступному етапі необхідно було перевірити, як впливає концентрація ГА та тривалість процесу іммобілізації на роботу біосенсора. Відповідно було перевірено залежність величини відгуків біосенсора на різні концентрації аргініну від концентрації ГА під час іммобілізації (рис. 4.12). Проаналізувавши графік, можна дійти висновку, що концентрації ГА від 0,1% до 0,5% - є найбільш ефективними для процесу іммобілізації ферментів. Отже, при створенні біферментного біосенсора на основі уреазу та аргінази, використовували саме такий діапазон концентрацій ГА.

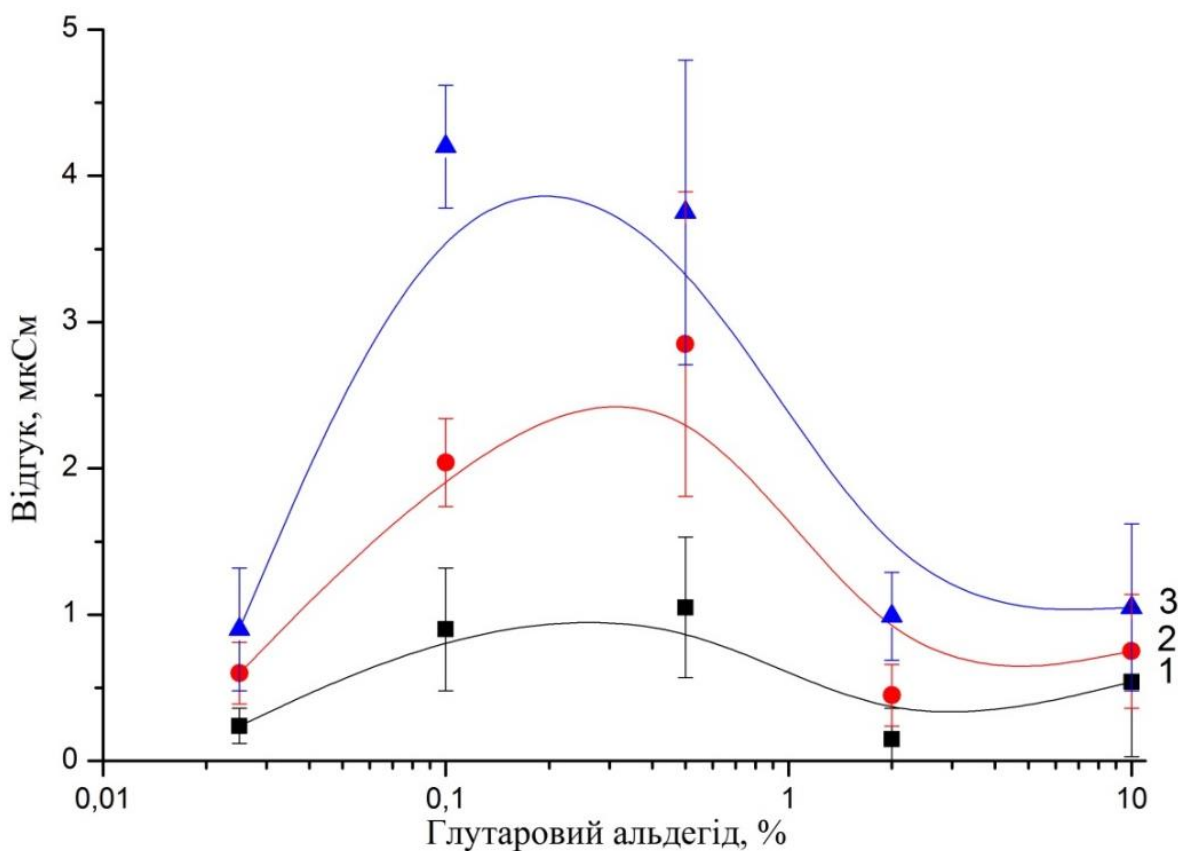


Рис. 4.12. Графік залежності величини відгуків біосенсора від концентрації ГА, що використовували при іммобілізації. Концентрації аргініну: 0,1 мМ (1), 0,4 мМ (2), 0,75 мМ (3). Концентрація кожного з ферментів у складі мембрани – 5 %. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4.

Окрім того, в роботі було перевірено вплив тривалості іммобілізації на чутливість розробленого біосенсора до аргініну (Рис. 4.13).

Було встановлено, що оптимальним часом для формування ферментних мембран на поверхні кондуктометричного перетворювача за допомогою ГА було є 30 хвилин.

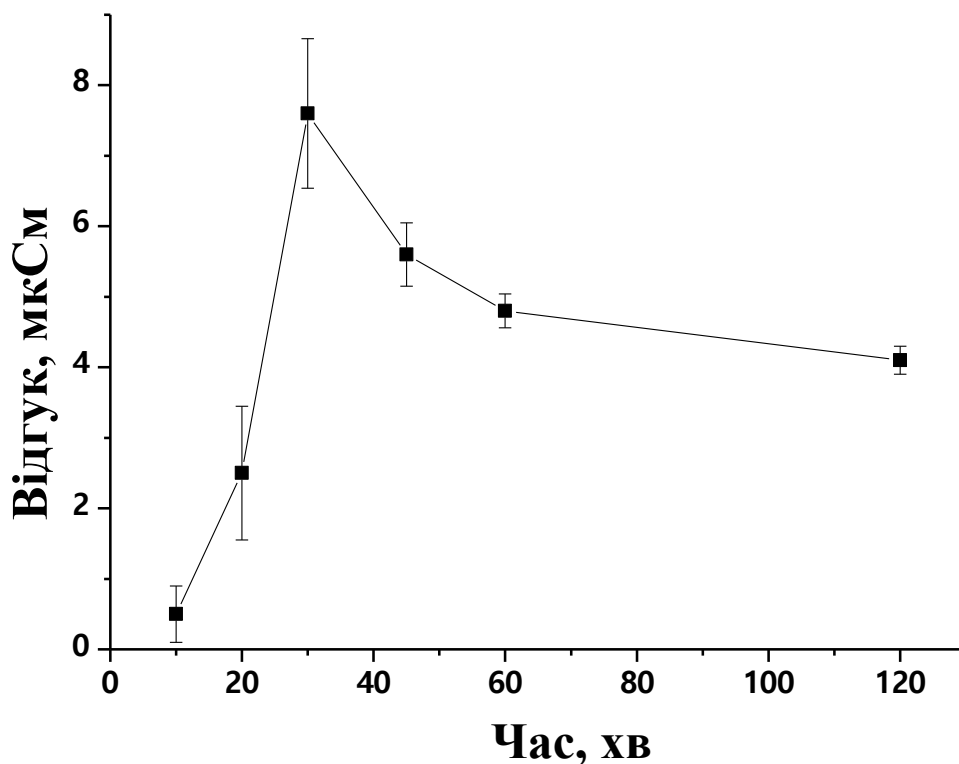


Рис. 4.13. Графік залежності величини відгуків біосенсора тривалість іммобілізації. Концентрація кожного з ферментів у мембрані – 5 %. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4.

4.1.2.5. Вивчення впливу параметрів аналізованого розчину на роботу біосенсора для визначення аргініну

Параметри роботи біосенсора зазвичай залежать від його власних характеристик, а також від характеристик розчину, в якому відбувається вимірювання.

На наступному етапі даної роботи досліджували вплив параметрів робочого буферного розчину на роботу запропонованого біосенсора для визначення аргініну, що включало визначення залежності величини відгуків біосенсору від іонної сили, буферної ємності та рН буферу.

Визначення впливу іонної сили на відгуки біосенсора. Особливістю кондуктометричних біосенсорів є те, що величина їх відгуків безпосередньо залежить від іонної сили розчину, в якому проводять вимірювання. З огляду на це, було досліджено впливу іонної сили (концентрації KCl у вимірювальній комірці) на величину відгуків розробленого біосенсора для визначення аргініну. Вимірювали відгуки на додавання 1 мМ аргініну при поступовому збільшенні концентрації KCl в розчині від 1 мМ до 120 мМ (рис. 4.14).

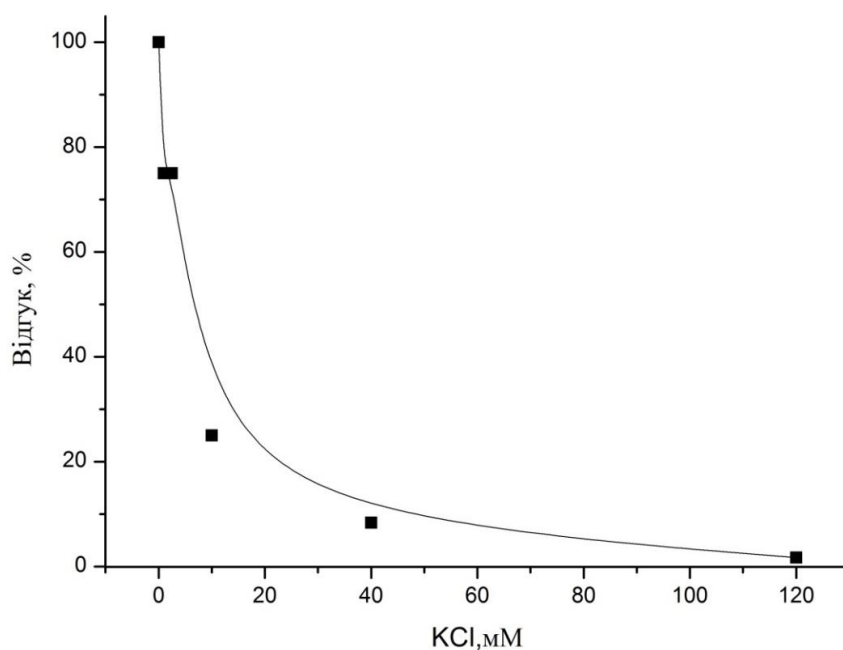


Рис. 4.14. Залежність величини відгуків біосенсора від іонної сили буферного розчину. Концентрація аргініну - 1 мМ. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4.

З графіку видно що, відгуки біосенсора зменшуються при збільшенні іонної сили розчину, а відповідно в подальших експериментах при дослідженні реальних зразків необхідно контролювати іонну силу для зменшення похибок вимірювань.

Дослідження впливу буферної ємності на відгуки біосенсора. Величина відгуків кондуктометричних біосенсорів залежить від буферної ємності розчину, в якому проводять вимірювання, тому було вивчено вплив буферної ємності на величину відгуків біосенсора. Досліджували величину відгуків на 1 мМ аргінін при різних концентраціях буферного розчину: 1 мМ; 2,5 мМ; 5 мМ; 10 мМ; 25 мМ; 50 мМ (рис. 4.15).

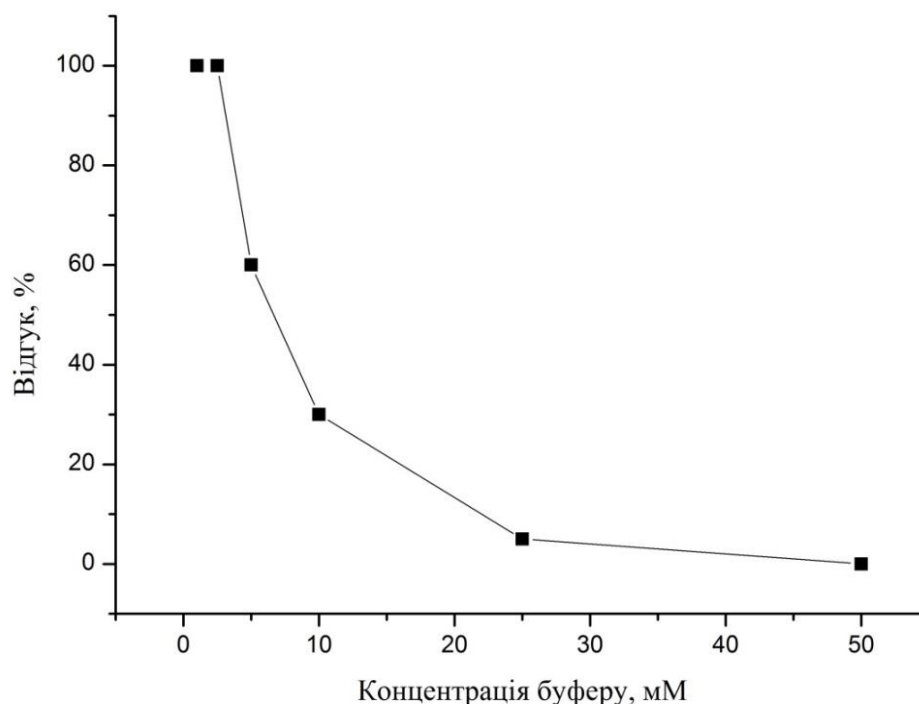


Рис. 4.15. Залежність величини відгуків біосенсора від буферної ємності робочого розчину. Концентрація аргініну – 1 мМ. Вимірювання проводили у фосфатному буферному розчині, рН 7,4.

З графіку видно, що відгуки біосенсора були значно більшими при нижчих концентраціях буферного розчину, але ж відомо, що при низьких концентраціях буферний розчин втрачає свої властивості, тому для подальших експериментів використовували 5 мМ буферний розчин.

Визначення впливу рН на відгуки біосенсора. Як відомо, під час іммобілізації ферменту може змінюватись рН-оптимум його роботи. До того ж, в основі запропонованого біосенсора лежить два фермента, кожен з яких має свій рН оптимум. Для того, щоб підібрати оптимальні умови функціонування біосенсора, було вивчено залежність величини відгуків цього біосенсора від зміни показника рН робочого розчину. При проведенні цього експерименту використовували універсальний буфер, з однаковою буферною ємністю в широкому діапазоні значень рН. Відгуки отримували на 1 мМ аргініну (рис. 4.16).

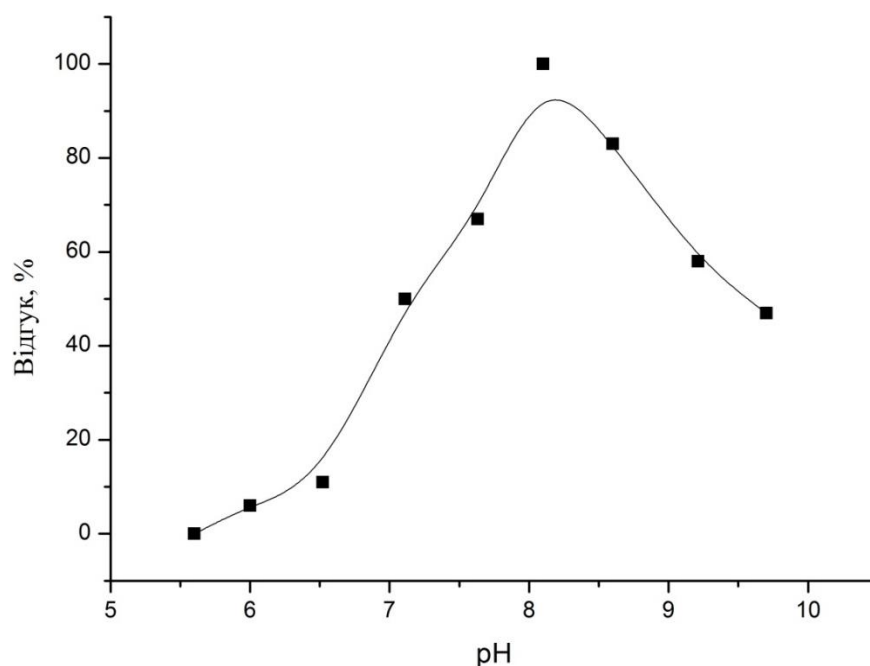


Рис. 4.16. Залежність величини відгуків аргінінового біосенсора від значення рН буферного розчину. Вимірювання проводили в універсальному буфері за кімнатної температури. Концентрація аргініну – 1 мМ.

З представленого графіку можна зробити висновок, що максимальні відгуки біосенсора було отримано при роботі в буферному розчині з рН 8,1. В подальших дослідженнях використовували буферний розчин саме з цим значенням рН (5 мМ ТРИС буфер, рН 8,1).

4.1.2.6. Визначення відтворюваності і операційної стабільності сигналів та стабільності при зберіганні аргінінового біосенсора

Для належної роботи біосенсора, дуже важливими характеристиками є його відтворюваність та операційна стабільність сигналу. Для перевірки відтворюваності відгуків пропонованого біосенсора на аргінін, впродовж певного часу, отримували відгуки біосенсора на внесення 1мМ аргініну. При цьому інтервал становив 10-15 хвилин, а біосенсор весь час між вимірюваннями залишався у робочому буферному розчині при постійному перемішуванні (рис. 4.17). Як можна побачити з графіку, біосенсор характеризувався високим рівнем відтворюваності сигналів. Похибка вимірювання не перевищувала 5%.

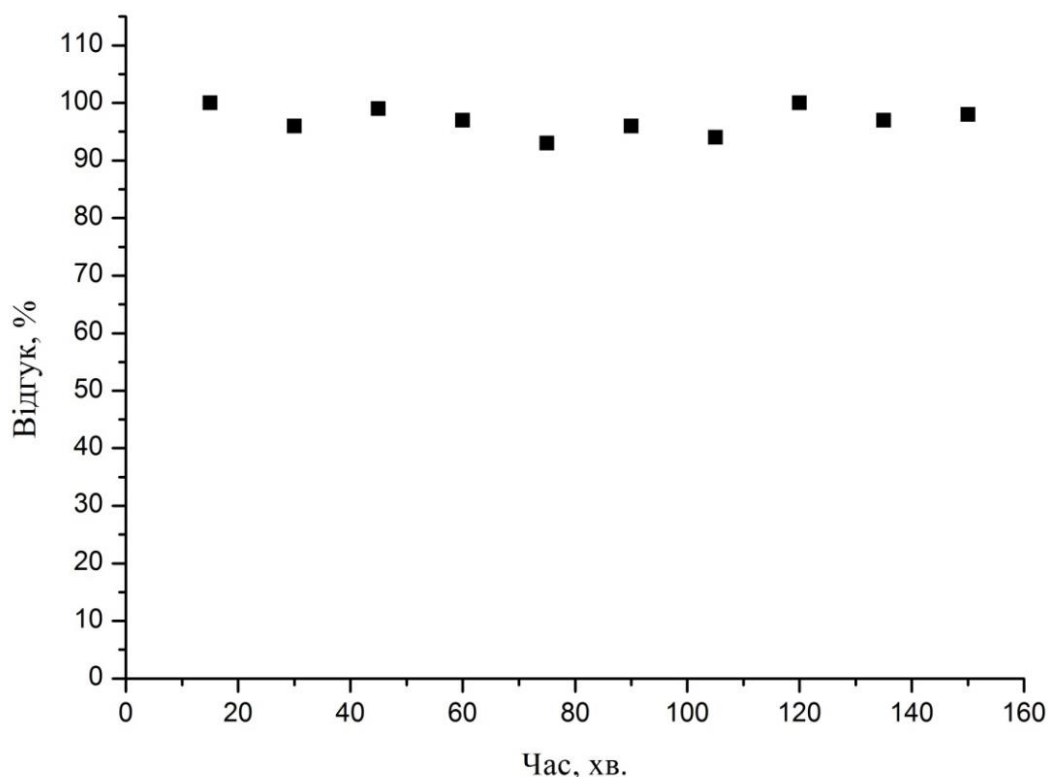


Рис. 4.17. Відтворюваність сигналів біосенсора. Вимірювання проводили у 5 мМ ТРИС буферному розчині, рН 8,1, за кімнатної температури, концентрація аргініну – 1 мМ.

Для визначення операційної стабільності біосенсора, впродовж 4-х днів отримували по 4 послідовні відгуки на 1 мМ аргініну з інтервалом у 10-15 хв., між серіями відгуків біосенсор зберігали в сухому стані при температурі від +2 до +6 °С (рис. 4.18). Впродовж усього експерименту спостерігалось незначне зменшення середнього відгуку на аргінін. Проте в цілому, запропонований біосенсор для визначення аргініну мав високу операційну стабільність протягом 4-х днів роботи.

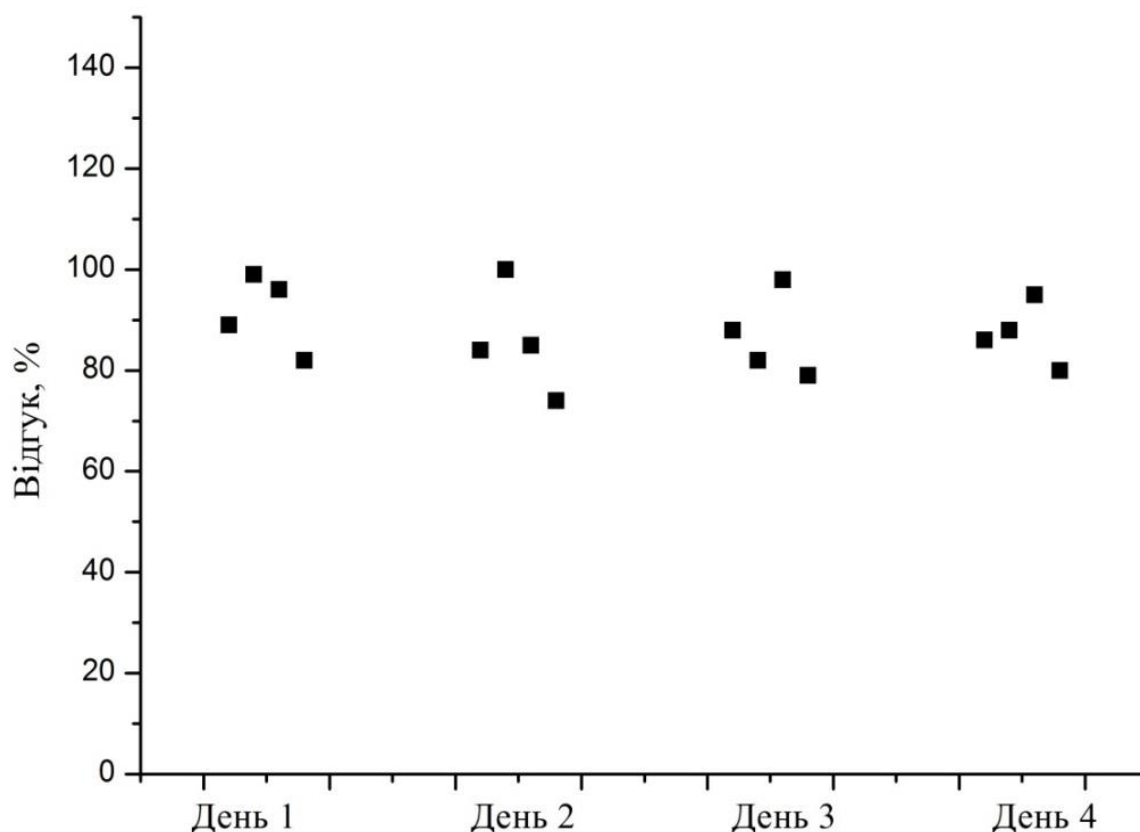


Рис. 4.18. Операційна стабільність сигналів біосенсора протягом 4-х днів. Вимірювання проводили у 5 мМ ТРИС буферному розчині, рН 8,1, за кімнатної температури, концентрація аргініну – 1мМ.

Також в роботі було перевірено стабільність біосенсорів при зберіганні в сухому стані за температури $+4^{\circ}\text{C}$. Експеримент проводили протягом місяця, активність сенсорів перевірялась раз в 4-6 днів. За 30 днів зберігання біосенсори втратили до 20-25% активності.

4.1.2.7. Підсумки

Для розробки аргінінового біосенсора на основі уреазу та аргінази було проведено порівняння декількох традиційних методів іммобілізації ферментів, та вибрано метод поперечної зшивки молекул ферментів та БСА за допомогою глутарового альдегіду в краплі. Далі в роботі проведено підбір оптимальних умов іммобілізації, а саме підбрано оптимальні концентрації ГА (0,1-0,5%) та обох ферментів (5%) в складі біоселективної мембрани та встановлено час процесу іммобілізації (30 хв). Також було вивчено вплив параметрів робочого розчину (буферна ємність, іонна сила та рН) на роботу біосенсора для визначення аргініну. Крім того, було вивчено відтворюваність та операційну стабільність запропонованого біосенсора протягом 4-х днів роботи.

4.1.3. Триферментний кондуктометричний біосенсор для визначення мальтози

4.1.3.1. Вступ

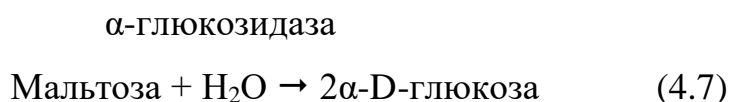
Значної популярності в харчовій промисловості набули мальтозні патоки, які характеризуються високою термостабільністю, низькою гігроскопічністю та в'язкістю, мають солодкий смак та не кристалізуються при зберіганні. Окрім того, мальтоза має високу енергетичну цінність та

швидко засвоюється організмом. Порівняно з іншими низькомолекулярними вуглеводами, мальтозні патоки є найбільш ефективними антикристалізаторами сахарози. Через свої унікальні властивості, мальтозні патоки використовуються при виробництві широкого спектру кондитерських виробів (карамелі, заморожених молочних виробів, мармеладів, плодово-ягідних консервацій, тощо). Мальтоза також використовується як замітник сахарози в різних галузях харчової промисловості, наприклад, при виробництві продуктів дитячого харчування, оскільки є менш алергенною у порівнянні із сахарозою. Мальтозу використовують у виробництві дієтичного, дитячого та спортивного харчування, а також у виробництві хліба, вина, консерв, при виготовленні пива і квасу. Крім того, свого застосування мальтоза знайшла в мікробіології та фармакології [237].

У зв'язку з вищесказаним, стає зрозумілою необхідність у створенні добре налагодженої системи моніторингу концентрації мальтози в харчовому виробництві та в медицині. Більш того, визначення мальтози, може стати в нагоді і в ензимології та мікробіології - для більш детального вивчення процесів ферментації, бродіння, тощо.

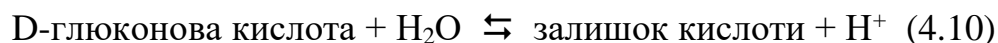
4.1.3.2. Принцип роботи біосенсора для визначення мальтози

В основі роботи триферментного кондуктометричного біосенсора для визначення мальтози лежить каскад ферментативних реакцій:



ГОД



$$\Downarrow$$


α -Глюкозидаза, мутаротаза та глюкозооксидаза послідовно розщеплюють мальтозу до перекису водню та D-глюконолактону. Глюконолактон спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, яка дисоціює на залишок кислоти і протон, в результаті чого змінюється провідність розчину, яку реєструють за допомогою кондуктометричного перетворювача [238].

Оскільки в складі біоселективного елементу біосенсора присутня ГОД, мультиферментний біосенсор окрім мальтози чутливий ще і до глюкози. Співвідношення відгуків даного біосенсора на глюкозу та мальтозу є дуже важливим показником при аналізі реальних зразків, тому в процесі розробки та оптимізації триферментного біосенсора, перевірялась його чутливість як до мальтози так і до глюкози.

4.1.3.3. Вплив параметрів аналізованого розчину на роботу біосенсора для визначення мальтози

Основна мета розробки – це створення мультиферментного біосенсора для аналізу мальтози в біотехнологічних процесах виготовлення напоїв та самих напоїв. Тому перш за все необхідно вивчити залежність роботи біосенсора від властивостей середовища, де проводять вимірювання.

Як відомо, після іммобілізації фермент може мати інший рН оптимум роботи в порівнянні з нативним станом. Ще більш складна ситуація виникає

коли біоселективний елемент біосенсора складається з трьох ферментів, кожен з яких має свій рН оптимум. Тому необхідно було дослідити вплив рН буферного розчину на роботу біосенсора для визначення мальтози. 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 сигналів на додавання у вимірювальну комірку 0,5 мМ мальтози та 0,5 мМ глюкози від рН мали дзвоноподібну форму з максимумом при рН 6,0 (рис. 4.19).

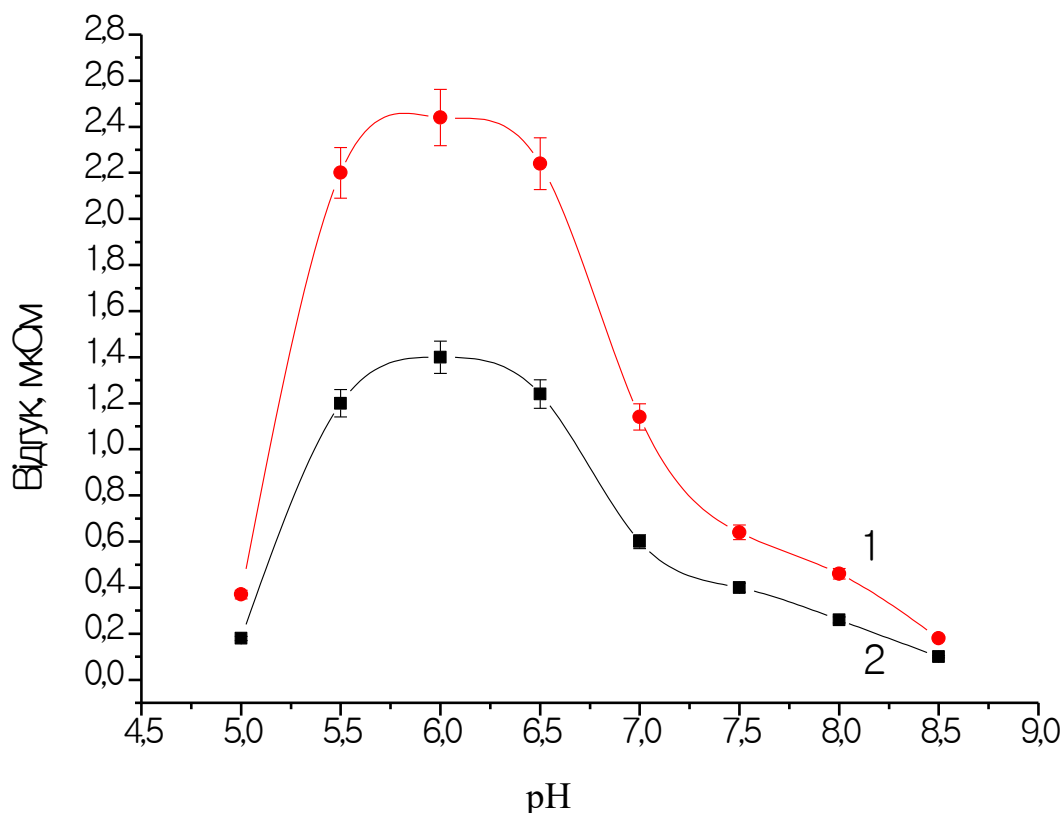


Рис. 4.19. Залежності відгуків мальтозного біосенсора від рН розчину при додаванні 0,5 мМ глюкози (1) та 0,5 мМ мальтози (2). Вимірювання проводилися в універсальному буферному розчині.

Реальні біологічні зразки можуть характеризуватися значною іонною силою. Наприклад, у їхньому складі можуть бути катіони металів, що

присутні в будь-яких організмах (K^+ , Na^+ , Mg^{2+} та ін.), а також аніони органічних та неорганічних кислот. Враховуючи використання кондуктометричного методу вимірювання, дослідження впливу іонної сили та буферної ємності розчину на роботу біосенсора є обов'язковим.

На рис. 4.20 представлено залежності величин відгуків біосенсора на внесення 0,5 мМ глюкози та 0,5 мМ мальтози від різних концентрацій буферного розчину.

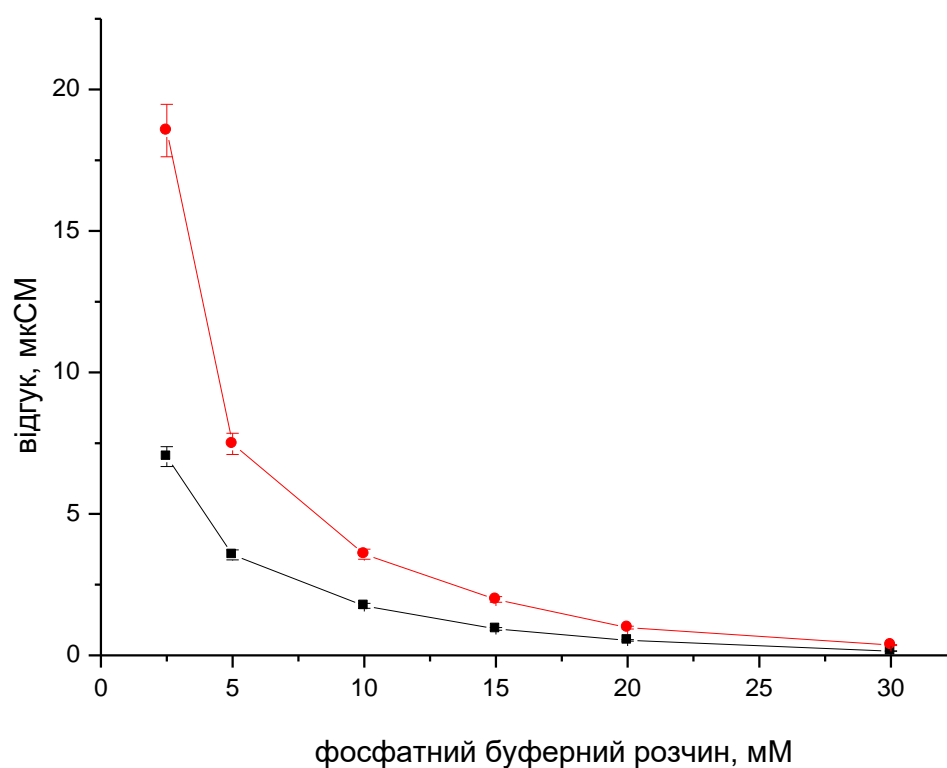


Рис. 4.20. Залежності величин відгуків біосенсора на внесення 0,5 мМ мальтози (1) та 0,5 мМ глюкози (2) від концентрації буферного розчину.

З графіку видно, що при збільшенні концентрації буферного розчину величина відгуків на глюкозу та мальтозу зменшується. Зниження відгуків на субстрат при збільшенні концентрації буферного розчину, пов'язано із

зростанням фонові провідності та буферної ємності розчину, що треба враховувати при проведенні аналізів в подальшому.

Щоб дослідити вплив іонної сили розчину на роботу мультиферментного біосенсора для визначення мальтози, було отримано величину відгука біосенсора на 0,5 мМ мальтози у буферних розчинах за різної концентрації КСІ (рис. 4.21).

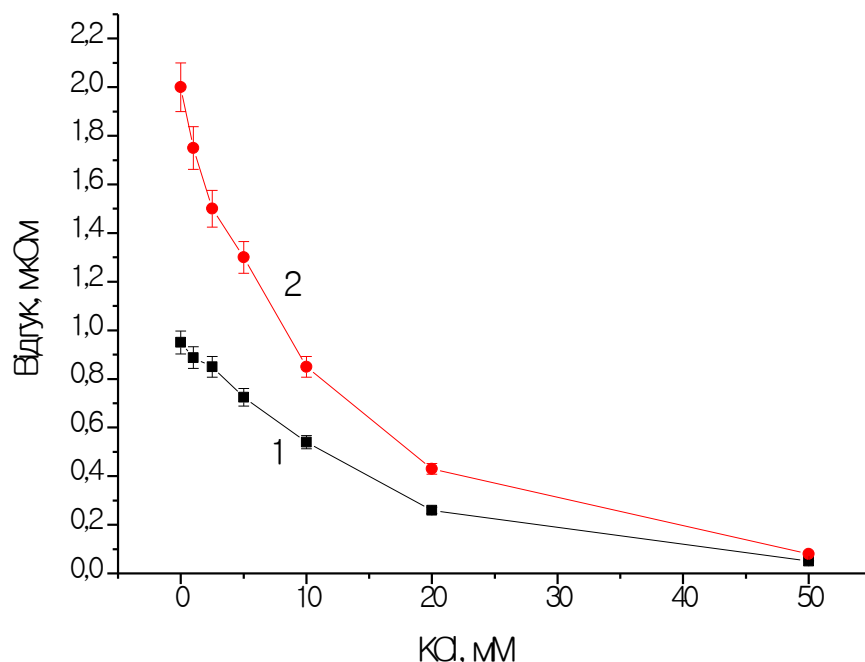


Рис. 4.21. Залежність величини відгуку мальтозного біосенсора на внесення 0,5 мМ мальтози (1) та 0,5 мМ глюкози (2) у розчин від концентрації КСІ в 10 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,0.

Встановлено, що при збільшенні іонної сили сигнали як на мальтозу, так і на глюкозу зменшуються. Спостерігається різке падіння величини 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.

4.1.3.4. Дослідження відтворюваності та стабільності при зберіганні сигналів біосенсора для визначення мальтози

Важливою характеристикою біосенсора, є стабільність його роботи при тривалому використанні. Тому на даному етапі роботи, було поставлено за мету - перевірити операційну стабільність розробленого біосенсора (рис. 4.22).

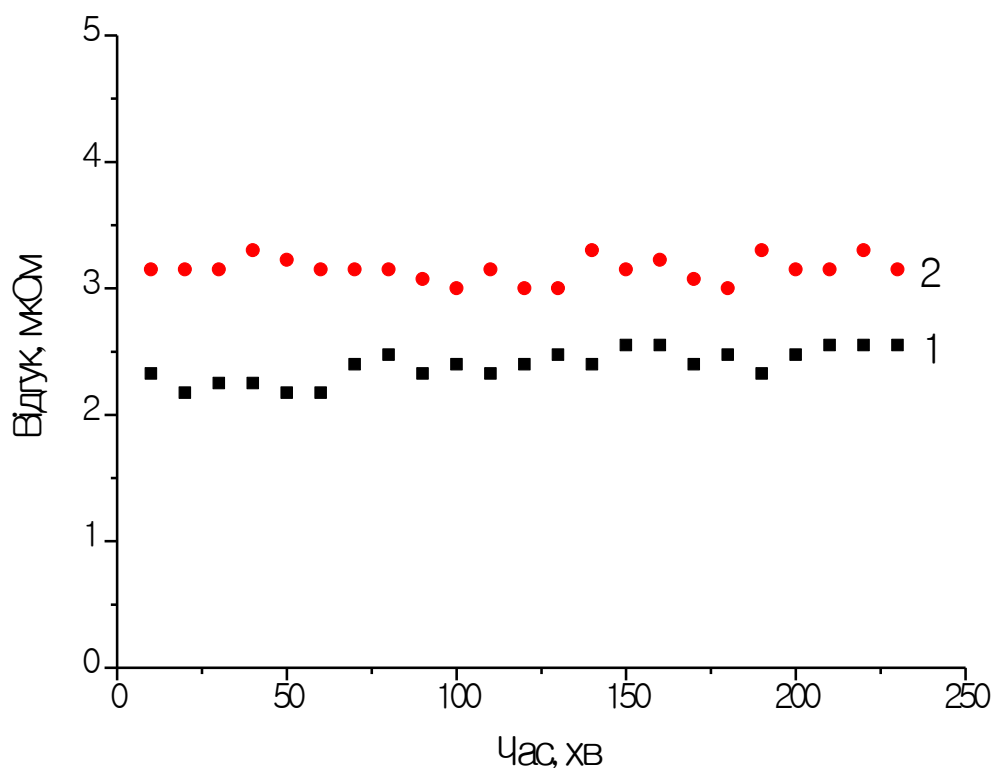


Рис. 4.22. Операційна стабільність сенсора для визначення мальтози. Вимірювання проводилися в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,0, у комірку вносили 0,25 мМ мальтози (1) та 0,25 мМ глюкози (2).

Вибрана для досліджень концентрація мальтози (0,25 мМ) лежала на лінійному відрізку калібрувальної кривої біосенсора. З рис. 4.22 видно, що біосенсор характеризувався високою відтворюваністю сигналу.

На рис. 4.23 зображено залежності відгуків мальтозного біосенсора на внесення глюкози та мальтози від часу під час їхнього зберігання в сухому стані за температури $+4^{\circ}\text{C}$. Протягом перших чотирьох днів відгуки мальтозного біосенсора на мальтозу падають вдвічі. А протягом першого тижня відгук мальтозного біосенсора на мальтозу складає лише 10% від початкового. Співвідношення між відгуками на мальтозу та на глюкозу у мальтозного сенсора з часом росте. Таким чином, мальтозний сенсор для роботи можна використовувати лише протягом першого тижня.

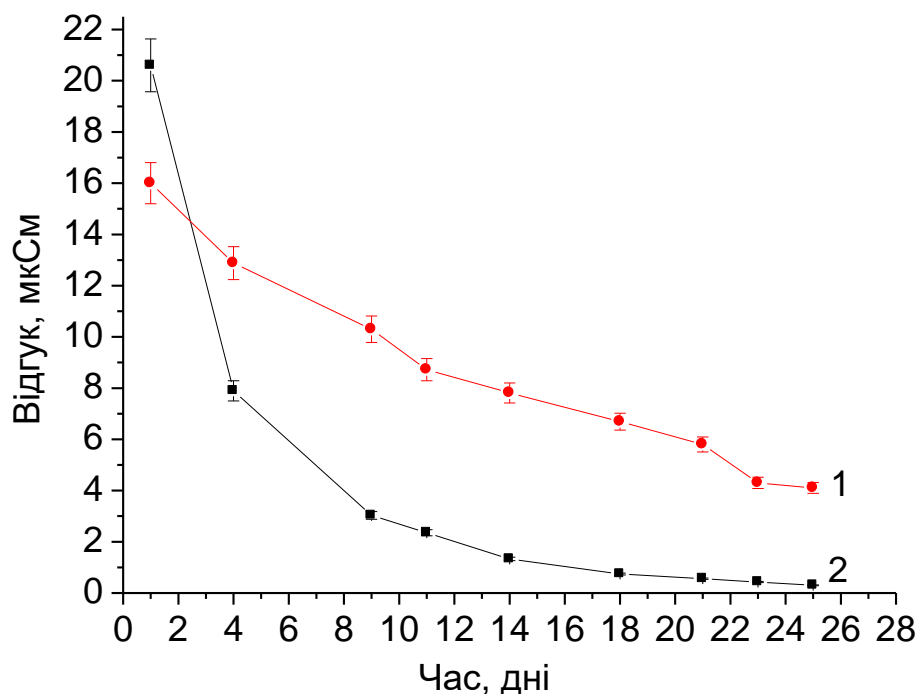


Рис. 4.23. Стабільність мальтозних біосенсорів під час їхнього зберігання в сухому стані за температури $+4^{\circ}\text{C}$. Вимірювання проводили в 10 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,0. Концентрація внесеної глюкози (1) та мальтози (2) у комірці - 0,5 мМ.

4.1.3.4. Перевірка селективності мультиферментного біосенсора для визначення мальтози

Дуже важливим показником роботи кондуктометричних біосенсорів є селективність. Для вивчення селективності мальтозного кондуктометричного біосенсора було виконано низку дослідів по вивченню реакції кондуктометричного біосенсора для визначення мальтози на вміст можливих інтерферуючих речовин (інших цукрів). Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. У комірку додавали інтерферуючі речовини (0,5 мМ) (табл. 4.3), при цьому за 100 % було обрано відгуки мальтозного біосенсора на 0,5 мМ мальтози. Біосенсор виявився селективним до ряду інтерферуючих речовин, тому може бути використан для роботи з реальними зразками. Відгук мальтозного біосенсора на глюкозу є цілком зрозумілий, оскільки до складу ферментної мембрани біосенсора входить ГОД. Тому для визначення мальтози в зразках, де є можливість присутності глюкози, необхідним є наявність другого сенсора, чутливого до глюкози.

Таблиця 4.3

Селективність біосенсора для визначення мальтози

0,5 мМ субстанції	Відносний відгук мальтозного біосенсора, %
Мальтоза	100
Глюкоза	139
Сахароза	4
Фруктоза	0
α -Лактоза	0
β -Лактоза	0
Манноза	0

4.1.3.5. Дослідження основних аналітичних характеристик триферментного біосенсора для визначення мальтози

На рис. 4.24 а, наведено типовий відгук кондуктометричного біосенсора для визначення мальтози. Базову лінію (стабільний початковий сигнал) отримували за відсутності субстрату. Після внесення субстрату в комірку з робочим розчином, 90 % максимальної величини відгуку досягалось за 1 - 2 хв. Час відгуку біосенсора залежав від товщини біоселективної мембрани біосенсора та концентрації мальтози, і складав 1-2,5 хв. Визначення концентрації субстрату за допомогою біосенсора можна проводити двома способами: оцінюючи максимальну швидкість зміни провідності розчину під час ферментативної реакції в мембрані, яка визначається першою похідною сигналу $V_0 = dS/dt$ (кінетичний режим вимірювань) та використовуючи максимальну величину відгуку біосенсора, коли в системі встановлюється рівновага (стаціонарний режим вимірювань).

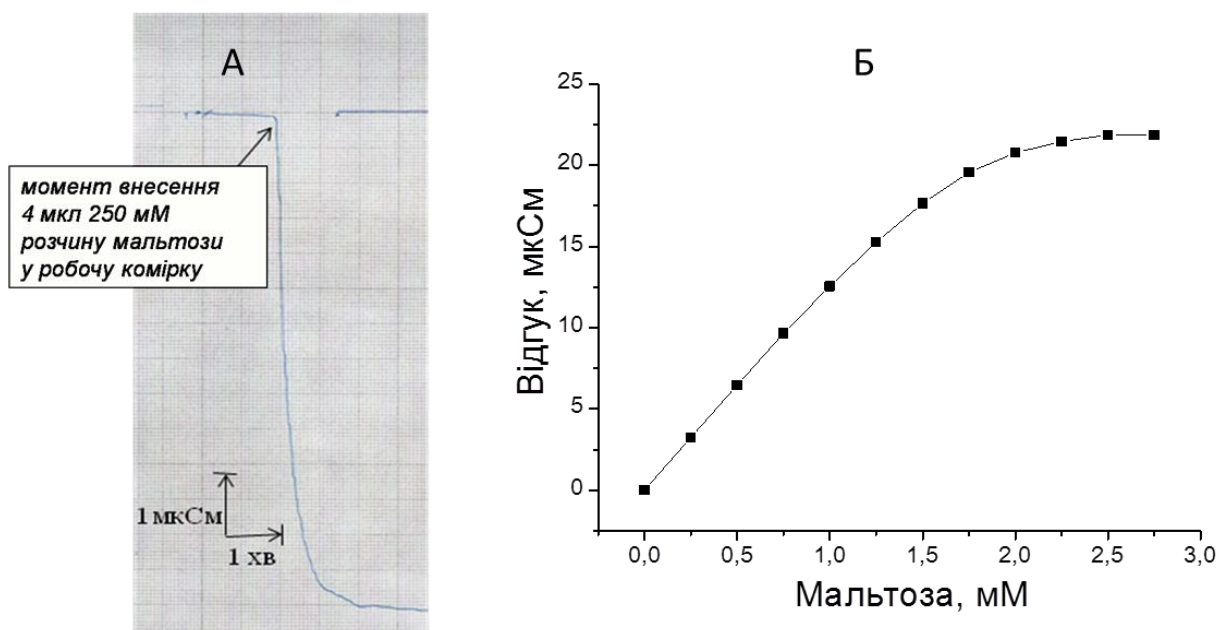


Рис. 4.24. Типові вигляди відгуку кондуктометричного біосенсора на 0,5 мМ мальтози (А) та калібрувальної кривої визначення мальтози (Б). Вимірювання проводилось в 10 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,0.

Калібрувальний графік біосенсорного визначення мальтози наведено на рис. 4.24 б. Лінійний діапазон роботи біосенсорів спостерігається від 0,25 до 1,5 мМ мальтози, ширина його залежить від методу іммобілізації, концентрації ферментів в складі біоселективної мембрани, тощо. Мінімальна границя визначення субстратів складає 0,001 мМ, та залежить від активності іммобілізованих ферментів в біоселективній мембрані і умов вимірювання. В 10 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,0 шум складав 0,03 - 0,06 мкСм. При зменшенні концентрації буферного розчину шум дещо збільшувався. Час визначення концентрації мальтози кондуктометричними біосенсорами складав 1-2,5 хвилини та залежав від товщини мембрани. При збільшенні товщини мембрани час відгуку теж збільшувався, що пов'язано з дифузійними процесами в мембрані.

4.1.3.6. Підсумки

Створено кондуктометричний біосенсор для визначення мальтози, в якому роль чутливого елемента відіграє триферментна мембрана, та досліджено його аналітичні характеристики при роботі з модельними зразками (залежність відгуку від рН, іонної сили та буферної ємності аналізованого розчину). Розроблений кондуктометричний біосенсор характеризується високою операційною стабільністю та відтворюваністю сигналу. Стабільність розробленого мультиферментного біосенсора була не найкращою, сенсор можна було використовувати лише протягом першого тижня. Розроблений кондуктометричний біосенсор виявився високоселективним до ряду інтерферентів. Нажаль, розроблений мультиферментний біосенсор був чутливим до глюкози, тому для визначення мальтози в зразках, необхідним є наявність другого сенсора, чутливого тільки

до глюкози. У подальшому передбачається відпрацювання методики визначення мальтози в реальних зразках.

4.1.4. Амперометричний біосенсор на основі двох ферментів для визначення ацетилхоліну

4.1.4.1. Вступ

Ацетилхолін – це органічна сполука, що являє собою складний ефір оцтової кислоти та холіну. Ацетилхолін відіграє роль нейромедіатора у нервовій системі багатьох тварин. Синтез ацетилхоліну відбувається в нейронах шляхом ацетилювання холіну ферментом холінацетилтрансферазою. Утворений ацетилхолін зв'язується зі специфічними білками-носіями, утворюючи комплекси, що не розщеплюється ацетилхолінестеразою. Під час проведення нервового імпульсу, під дією іонів калію, ці комплекси дисоціюють і відбувається виділення ацетилхоліну. Ацетилхолін що вивільнився, взаємодіє з холінорецепторами постсинаптичної мембрани в синаптичній щілині чим спричиняє виникнення нервового імпульсу. Після цього ацетилхолін розщеплюється ацетилхолінестеразою. Це дуже важливий процес, оскільки накопичення ацетилхоліну негативно впливає на обмін речовин в організмі, спричинює сповільнення частоти серцевих скорочень, звуження альвеол бронхів та розширення артеріол, призводить до отруєння організму [239].

Ацетилхолін передає імпульси від одного нейрона до іншого. Головною функцією ацетилхоліну є стимуляція скелетно-м'язової системи. Саме він забезпечує скорочення та розслаблення м'язів. Також ацетилхолін впливає на пам'ять та здатність до навчання. Відсутність ацетилхоліну у певних ділянках головного мозку призводить до розвитку хвороб Альцгеймера, Паркінсона,

епілепсії, деменції та інших, при яких спостерігаються збої у роботі механізму передачі сигналів за участю ацетилхоліну. Для вироблення ацетилхоліну необхідний холін, тому при нестачі холіну в організмі, виникає дефіцит ацетилхоліну і нервові розлади [240, 241]. Ацетилхолін відповідає за більшу частину стимуляції м'язів, у тому числі м'язів шлунково-кишкового тракту.

Моніторинг рівня ацетилхоліну в сироватці крові є дуже важливим для виявлення нервово-м'язових захворювань, таких як, міастенія, порушення холінергічної нейротрансмісії [242, 243].

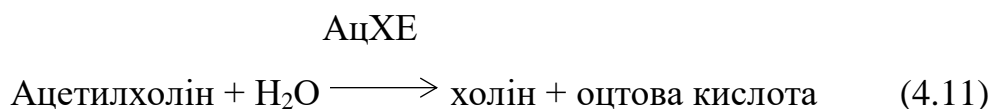
Безпосередній моніторинг нейротрансмітерів у живих організмах попри численні дослідження, проведені протягом двох останніх десятиріч, залишається досить актуальним. Величезна кількість нейротрансмітерів у нейронній мережі мозку у досить малих концентраціях, становлять серйозну технічну перешкоду, коли йдеться про їх визначення. Ацетилхолін є добре відомим трансмітером, через його роль у сигнальних зв'язках мозку. Синтезований у різних нейронних вузлах, він виділяється у специфічних місцях по-різному у відповідності до поведінкових ситуацій (сон, пробудження, увага, стрес та. ін.).

З технологічної точки зору, дотепер розроблено велику кількість методів визначення нейротрансмітерів, наприклад, біохімічний аналіз із застосуванням радіоактивних міток [244, 245], хроматографічний аналіз (ВЕРХ) [246–248], мас-спектрометрія, мікродіаліз з електрохімічним визначенням [249, 250], та інші. Проте цим методам притаманні деякі недоліки, основні з них: довготривалість аналізу, низька анатомічна розподільча здатність при *in vivo* дослідженнях і відносна складність необхідного супутнього обладнання. Альтернатива для подолання цих недоліків вбачається у застосуванні імплантованих до організму мікробіосенсорів.

Метою даної частини роботи було створення амперометричного біосенсора на основі двох ферментів для визначення концентрацій ацетилхоліну у біологічних рідинах.

4.1.4.2. Принцип роботи амперометричного біосенсора на основі коїмобілізованих ацетилхолінестерази та холіноксидази

В основі роботи амперометричного біосенсора для визначення ацетилхоліну лежать ферментативні реакції (4.11) і (4.12), які відбуваються в біоселективній мембрані.



Під дією ацетилхолінестерази (АцХЕ), ацетилхолін (АцХ) розкладається на холін і оцтову кислоту. Після цього, відбувається окиснення холіну за рахунок холіноксидази (ХОД), що супроводжується утворенням електрохімічно-активного пероксиду водню. При прикладанні позитивного потенціалу (+0,6 В) на електроді відбувається реакція розпадання пероксиду водню (4.13), в результаті якої відбувається зміна сили струму в робочій комірці, що реєструється вимірювальною установкою, як відгук біосенсора.

4.1.4.3. Підбір оптимальних умов формування біоселективного елементу

Робота біосенсора залежить від методики іммобілізації ферментів та співвідношення компонентів у складі біоселективного елементу, тому на першому етапі цього фрагменту роботи було підбірано оптимальні умови для створення біоселективної мембрани. Для дослідження було використано 3 варіанти іммобілізації ХОД та АцХЕ на перетворювачі: (1) іммобілізація ХОД першим шаром, АцХЕ – другим шаром; (2) іммобілізація АцХЕ першим шаром, ХОД – другим шаром; (3) коіммобілізація суміші ХОД і АцХЕ єдиним шаром. Важливими аналітичними характеристиками біосенсорів є їх мінімальна межа визначення, чутливість до субстрату та відтворюваність відгуків. Тому для вибору найкращого варіанту іммобілізації було проаналізовано кількісні зміни цих характеристик для біосенсорів, виготовлених в різний спосіб. Результати наведені в табл. 4.4.

Таблиця 4.4

Порівняння аналітичних характеристик біосенсорів для різних варіантів іммобілізації ферментів

Варіант іммобілізації	Відгук на 1 мМ АцХ, нА	Відгук на 1 мМ холіну, нА	Відтворюваність відгуків на АцХ, %	Мінімальна межа визначення АцХ, мкМ
I шар: ХОД 8% II шар: АцХЕ 0,5%	13,8	25	10,7	10,3
I шар: АцХЕ 0,5% II шар: ХОД 8%	65,4	74	13,4	4,6
Ко-іммобілізація: 0,5% АцХЕ + 8% ХОД	1,6	2,6	18,8	103,9

Як видно з таблиці, найбільшими величиною відгуку, а отже, і чутливістю до 1 мМ ацетилхоліну, характеризувалися біосенсиори на основі двошарової мембрани (перший шар виготовляли з використанням ферментного розчину (0,5% АцХЕ), а другий шар – 8% ХОД). Також, за рахунок використання цього варіанту іммобілізації можна вимірювати мінімальні концентрації ацетилхоліну в зразках. Мінімальна похибка вимірювання спостерігалась при іммобілізації першим шаром 8% ХОД, і другим шаром 0,5% АцХЕ, однак і чутливість до холіну і ацетилхоліну в цьому випадку були мінімальними. Біосенсиори, виготовлені шляхом ко-іммобілізації обох ферментів, характеризувались найгіршими аналітичними характеристиками. Через це, в подальшій роботі біосенсиори виготовляли шляхом іммобілізації 0,5% АцХЕ в першому шарі мембрани та 8% ХОД в другому шарі.

4.1.4.4. Дослідження впливу параметрів аналізованого розчину на роботу двоферментного біосенсора

Оскільки зразки реальних біологічних розчинів зазвичай мають високі іонну силу та буферну ємність, що часто ускладнює проведення біосенсорного аналізу, було вивчено вплив основних параметрів розчину на функціонування біосенсора для визначення концентрацій ацетилхоліну.

Для вивчення впливу буферної ємності на величину відгуків біосенсора, був використаний робочий буферний розчин HEPES в діапазоні концентрацій від 1 мМ до 50 мМ. Результати цього експерименту представлені на рис. 4.25. Експеримент показав, що зміна значення концентрації буфера від 5 мМ до 50 мМ незначної мірою впливає на роботу біосенсору.

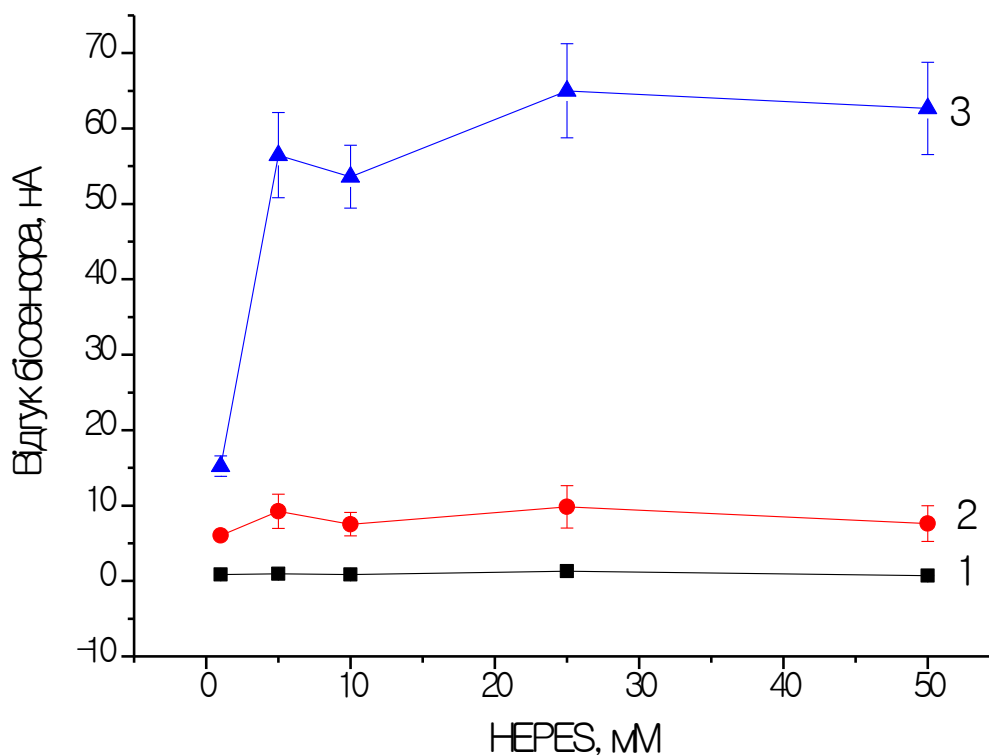


Рис. 4.25. Залежність величини відгуку біосенсора від концентрації буферного розчину. Концентрації ацетилхоліну – 10 мкМ (1), 100 мкМ (2) та 1000 мкМ (3). Вимірювання проводили в буферному розчині HEPES при різних концентраціях, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

У складі біологічних рідин часто присутні катіони одно- та двовалентних металів, а також аніони органічних та неорганічних кислот. Відомо що, іонна сила розчину змінюється зі зміною концентрації буферного розчину. Тому, дослідження величин відгуків біосенсорів за різної іонної сили розчину проводили з використанням робочого буферного розчину, що містив NaCl в концентраціях від 0 мМ до 100 мМ (рис. 4.26). З графіку видно, що різні концентрації хлориду калію в розчині не мають суттєвого впливу на чутливість біосенсора до ацетилхоліну.

Отже, з отриманих даних можна зробити висновок, що такі властивості розчину як буферна ємність та іонна сила майже не мають впливу на роботу біосенсора, що є типовим для амперометричних біосенсорів. Відповідно, біосенсор може використовуватися для аналізу біологічних зразків різного складу.

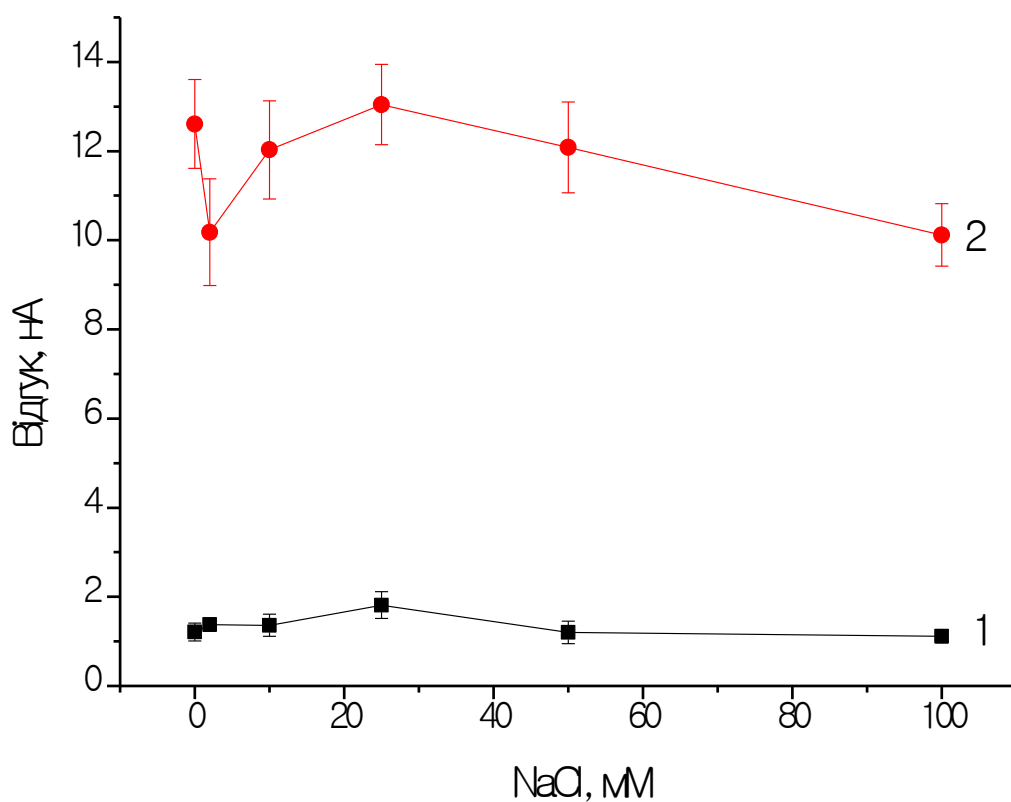


Рис. 4.26. Вплив концентрації NaCl (відповідно, зміни іонної сили розчину) на величину відгуку біосенсора. Концентрації ацетилхоліну – 10 мкМ (1) та 100 мкМ (2). Вимірювання проводили у 25 мМ буферному розчині HEPES, рН 7,4, при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

4.1.4.5. Залежність роботи біосенсора від рН

Відомо, що швидкість ферментативних реакцій може залежати від значення рН аналізованого розчину. Відповідно, необхідно було дослідити вплив рН буферного розчину на роботу біферментного біосенсора, оскільки внаслідок іммобілізації ферментів може змінюватись рН оптимум їхньої роботи. Для даних досліджень було використано універсальний буферний розчин (50 мМ лимонної кислоти, ТРИС-НСІ, дигідрофосфату калію, та тетраборату натрію), який має одну й ту саму буферну ємність у широкому діапазоні значень рН. Дослідження проводили у діапазоні значень рН від 6,2 до 8,7. Результати експерименту наведено на рис. 4.27.

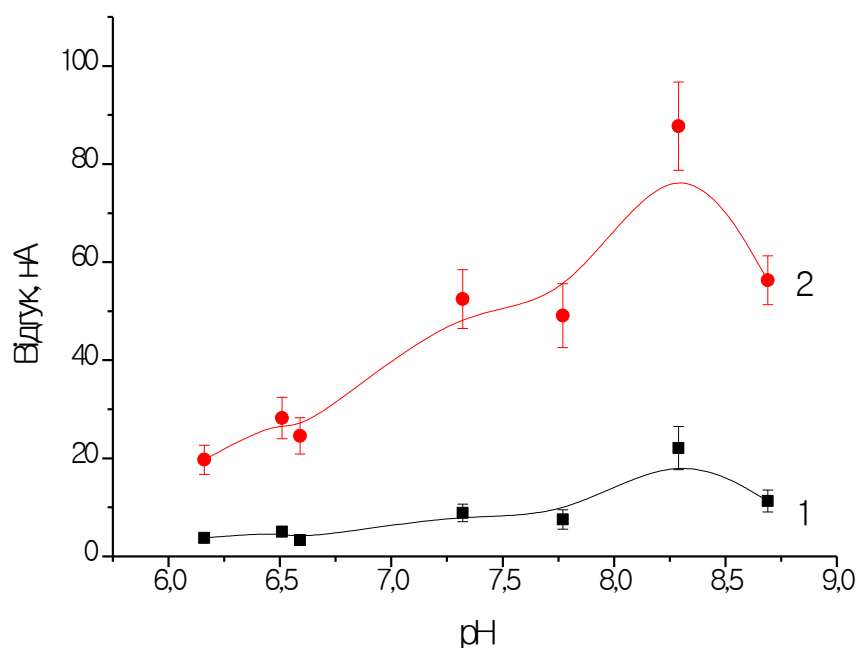


Рис. 4.27. Залежність величини відгуку біосенсора від значення рН буферного розчину. Концентрації АцХ – 100 мкМ (1) та 1000 мкМ (2). Вимірювання проводили у 50 мМ універсальному буферному розчині при різних значеннях рН за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Відомо, що рН оптимум нативних ферментів (АцХЕ та ХОД) знаходиться в діапазоні від 8 до 8,5, в той час, як максимальне значення відгуку біосенсора спостерігалось при рН 8,3. З цього можна зробити висновок, що рН-оптимум роботи ферментів практично не змінився після іммобілізації, що свідчить про адекватність підібраної методики іммобілізації.

В майбутньому біосенсор планується використовувати для вимірювання ацетилхоліну в зразках сировотки крові, тому наступні експерименти проводились при значенні рН, характерному саме для крові – 7,4, за якого відгуки амперометричного біосенсора не були максимальними, але залишалися достатньо високими для оптимального функціонування.

4.1.4.6. Операційна стабільність двоферментного біосенсора

Для комбінованої перевірки стабільної роботи та зберігання біосенсора було досліджено операційну стабільність розробленого біосенсора при визначенні ацетилхоліну впродовж декількох днів. Для цього, отримували по 3 відгуки на дві різні концентрації ацетилхоліну (100 мкМ та 1000 мкМ), після чого, біосенсор зберігали в сухому вигляді за температури -18°C . Через кілька діб, експеримент повторювався: знову отримували відгуки біосенсорів на ті ж самі концентрації ацетилхоліну. Сумарний термін зберігання становив 7 діб. Результати по дослідженню операційної стабільності представлено на рис. 4.28.

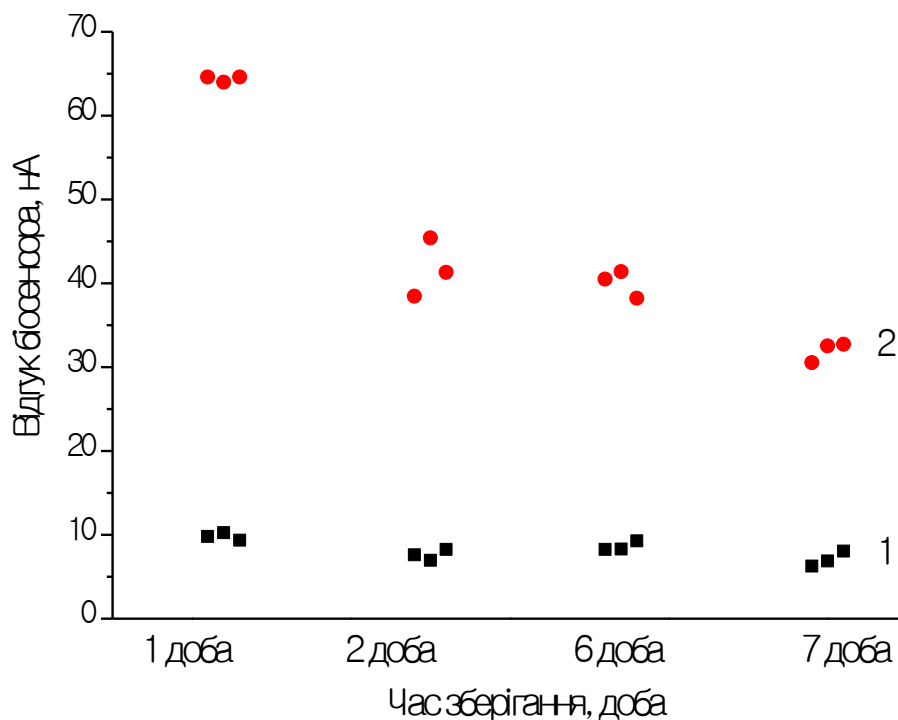


Рис. 4.28. Операційна стабільність відгуків біосенсора впродовж 7-ми днів. Концентрації ацетилхоліну – 100 мкМ (1) та 1000 мкМ (2). Вимірювання проводили в 25 мМ буферному розчині HEPES, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

З рисунку видно що, відгуки біосенсора поступово зменшувались протягом всього періоду вимірювань, але й через 7 діб, біосенсор все ще залишався придатним для використання за умови додаткового калібрування. За цей період величина відгуків біосенсора впала на 25% або 50%, в залежності від концентрації ацетилхоліну 100 мкМ або 1000 мкМ, відповідно.

4.1.4.7. Відтворюваність відгуків біосенсора

Для перевірки того, наскільки швидко в процесі безперервного використання біосенсора, відбувається вимивання іммобілізованих ферментів, чи наскільки зменшується їхня активність, проводили перевірку

відтворюваності відгуків біосенсора при безперервній роботі. Для цього протягом одного робочого дня, і з інтервалом у 15 хв отримували 18 відгуків на концентрації ацетилхоліну 100 мкМ та 1000 мкМ (рис. 4.29).

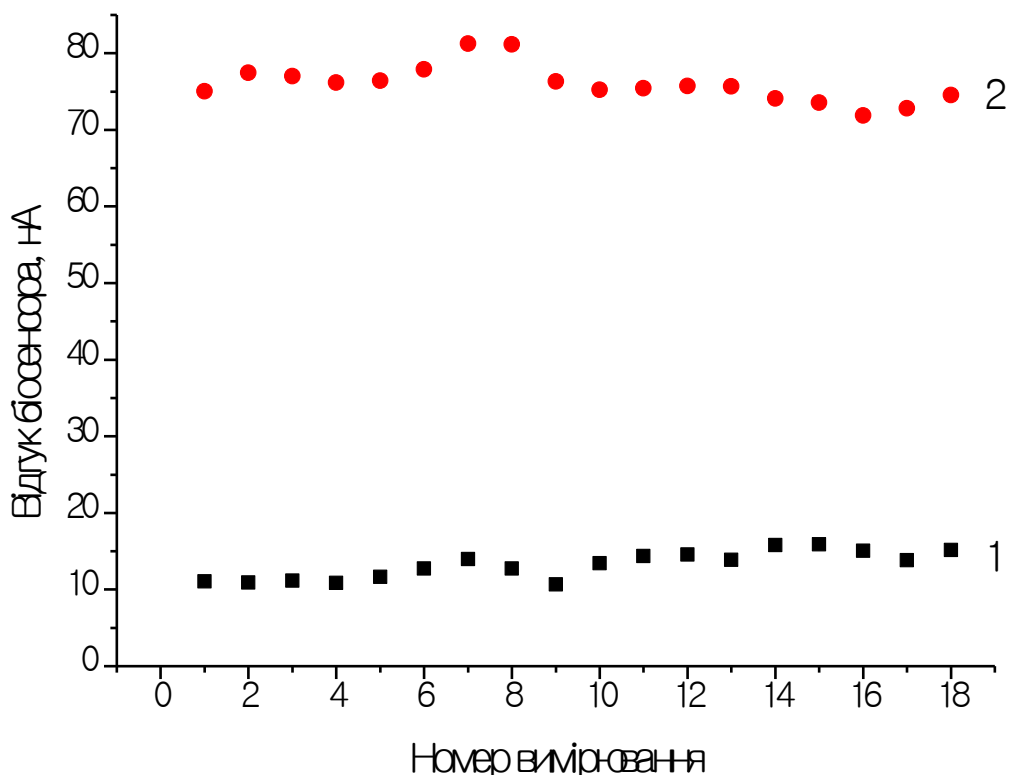


Рис. 4.29. Відтворюваність відгуків двоферментного біосенсора при безперервній роботі протягом декількох годин. Концентрації ацетилхоліну – 100 мкМ та 1000 мкМ. Вимірювання проводили у 25 мМ HEPES буфері, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

При цьому, біосенсор протягом усього дня знаходився у робочому буферному розчині з перемішуванням. Помітного падіння відгуків за 18 вимірювань не відбувалось, при цьому відносне стандартне відхилення відгуків біосенсора не перевищувало 3,5%.

4.1.4.8. Дослідження селективності біферментного біосенсора

Оскільки зазвичай біологічні зразки у своєму складі містять сполуки, що впливають на роботу біосенсора для визначення ацетилхоліну, необхідно було продемонструвати специфічність біосенсора саме до ацетилхоліну. Тож було перевірено чутливість біосенсора до низки можливих інтерферентів, таких як піруват, лактат, глутамат, холін та глюкоза. З рис. 4.30 видно, що біосенсор на основі ХОД та АцХЕ не реагував на додавання таких сполук у вимірювану комірку, і давав відгук тільки при додаванні холіну та ацетилхоліну. Така реакція на холін, є логічною, через присутність у складі біосенсорної мембрани холіноксидази.

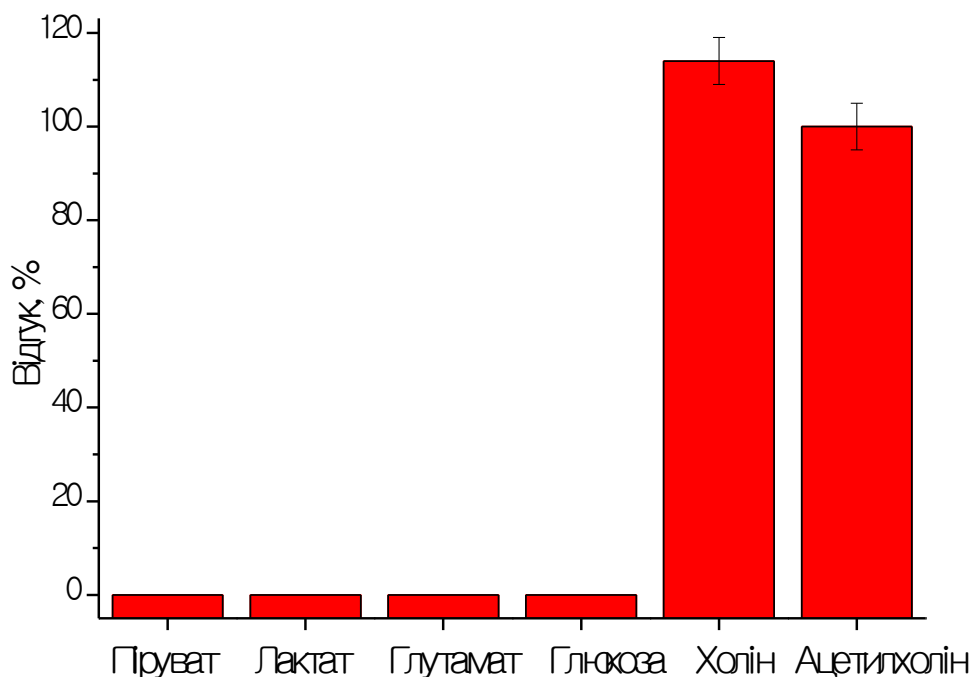


Рис. 4.30. Відгуки амперометричного біосенсора на внесення в робочу комірку різних речовин (за 1 мМ концентрації). Вимірювання проводили в 25

мМ буферному розчині HEPES, рН 7,4, за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

4.1.4.9. Аналітичні характеристики біосенсора

Після оптимізації умов виготовлення та функціонування біферментного біосенсора була побудована типова калібрувальна крива визначення ацетилхоліну (рис. 4.31) та отримано основні аналітичні характеристики біосенсора. Лінійну ділянку даної калібрувальної кривої можна описати рівнянням $I=1376,5 \cdot C + 2,6$ ($R^2=0,999$), де C – концентрація ацетилхоліну (мМ).

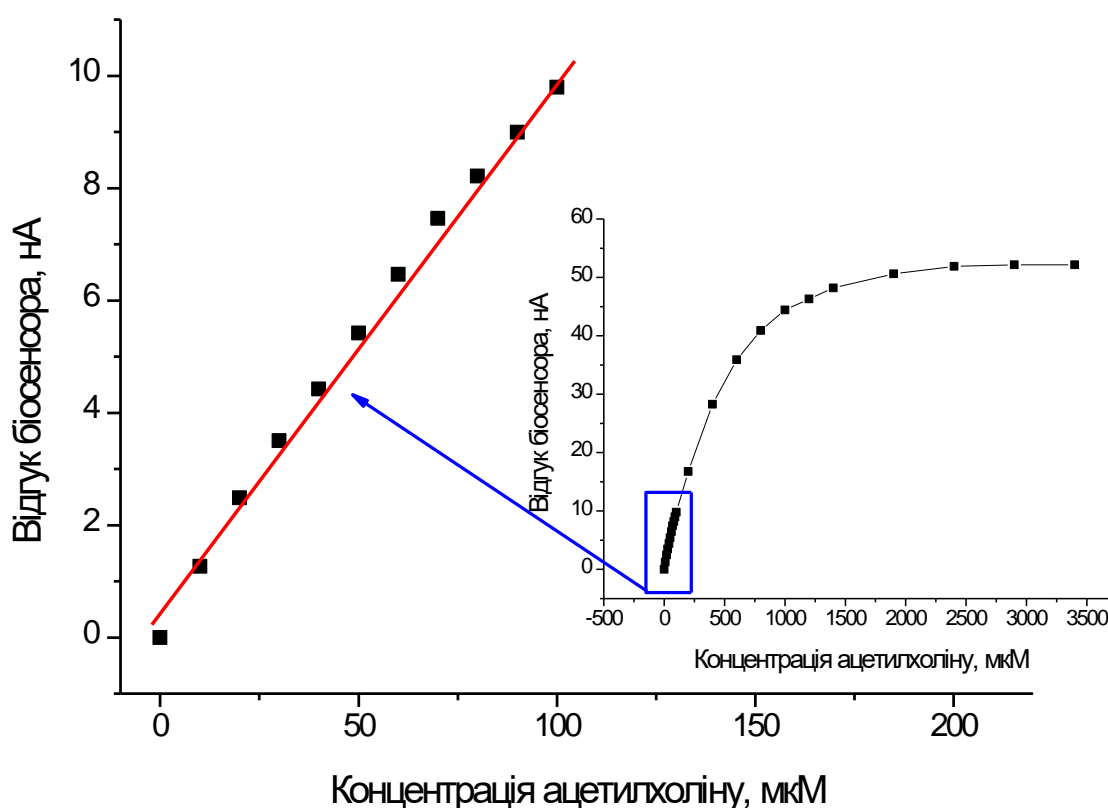


Рис. 4.31. Калібрувальна крива біосенсора на основі ХОД та АцХЕ для визначення ацетилхоліну. Вимірювання проводили в 25 мМ буферному розчині HEPES, рН 7,4, за постійного потенціалу + 0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Основні аналітичні характеристики мультиферментного біосенсора для визначення АцХ наведено у табл. 4.5. З отриманих даних, можна зробити висновок, що біосенсор характеризується високою чутливістю до субстрату при стабільній відтворюваній роботі, а також має мінімальний шум та дрейф базового сигналу, що дає змогу визначати мікромолярні концентрації АцХ.

Таблиця 4.5

Основні аналітичні характеристики біосенсора для визначення АцХ

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

4.1.4.10. Підсумки

Розроблено біосенсор для визначення АцХ. Для створення біоселективного елемента було перевірено декілька варіантів виготовлення біоселективної мембрани біосенсора. Найкращим методом виявився метод двошарової іммобілізації ХОД та АцХЕ: в якості першого шару іммобілізували АцХЕ, а в якості другого – ХОД. Показано, що основні параметри робочого буферного розчину (буферна ємність та іонна сила) суттєво не впливали на характеристики біосенсора. А при дослідженні впливу рН на роботу біосенсора виявилось, що максимальні відгуки біосенсора спостерігались при значенні рН 8,3. Біосенсор характеризувався гарною відтворюваністю сигналу та операційною стабільністю, з похибкою вимірювання до 3,5%.

Також було перевірено селективність біосенсора відносно можливих інтерферентів, які можуть бути присутніми в біологічних зразках, та показано, що розроблений біферментний біосенсор був чутливим до ацетилхоліну та холіну і не проявляв чутливості до інших. Визначено основні аналітичні характеристики біосенсора, а саме: чутливість до ацетилхоліну – 98 нА/мМ, лінійний діапазон роботи - 10-200 мкМ, мінімальна межа визначення - 3,8 мкМ, шум – 0,3 нА, дрейф - 0,1 нА/с. В подальшому, запропонований біосенсор на основі ХОД та АцХЕ може бути використаний для вимірювання концентрацій ацетилхоліну в зразках реальних біологічних рідин за умов використання ще одного моноферментного біосенсора чутливого до холіну. Також, біферментний біосенсор може бути використаний, як складова частина масиву біосенсорів для одночасного вимірювання декількох речовин.

4.2. Біосенсори на основі конкуренції ферментів за субстрат

Часто при розробці біосенсорів, під час вибору ферментативної системи в основі біоселективного елементу, 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 біосенсорів на основі конкуренції ферментів за субстрат. Схематичний вигляд усіх ферментативних реакцій, що були використані для розробки мультиферментних біосенсорів даного типу приведено в додатку В.

4.2.1. Амперометричний біосенсор на основі ГОД/ГК для визначення АТФ

4.2.1.1. Вступ

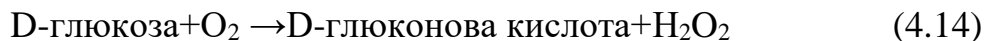
Аденозин-5-трифосфат (АТФ) – це макроергічна сполука, парисутня в усіх живих організмах, що відіграє ключову роль у енергетичному обміні клітини. В результаті досліджень в галузі біології та медицини впродовж останніх десятиліть, було виявлено додаткові функції АТФ, а саме - регуляція скорочення м'язів і агрегації тромбоцитів [251], васкулярних тонів і нейротрансмісії [252].

Зміни концентрації АТФ спричиняють суттєві ефекти у центральній нервовій системі ссавців. АТФ може впливати на вивільнення трансмітера, синаптичну пластичність, реакції на біль, цикли сну-діяльності, дихальні та рухові ритми, збудження, депресію, агресію, тощо [253]. Відповідно, оскільки ця сполука залучена до численних життєво значущих біологічних процесах, визначення АТФ є дуже важливим. До того ж, визначення АТФ може бути ефективно використане у харчовій індустрії, як маркер мікрогрибкового забруднення, а також при створенні інгібіторів специфічних кіназ та інших ферментів, як попередників для розробки ліків.

4.2.1.2. Принцип роботи АТФ біосенсора

Біоселективний елемент амперометричного мультиферментного біосенсора містить два коїммобілізовані ферменти: ГОД і гексокіназу (ГК). Відповідно в основі роботи біосенсора лежать такі ферментативні реакції:

ГОД



+600 мВ



ГК



Такий біосенсор є чутливим до обох субстратів: глюкози так і АТФ, через конкуренцію між ферментами за глюкозу. Якщо до аналізованого середовища внесено тільки глюкозу, мають місце реакції (4.14) і (4.15), і електрохімічний відгук біосенсора, пропорційний у певному діапазоні до концентрації глюкози, що генерується біосенсором, приймається за 100 %. При внесенні АТФ, має місце реакція (4.16), спричиняючи зменшення відгуку на глюкозу, отриманого за відсутності АТФ, причому це зменшення є пропорційним до концентрації АТФ у аналізованому розчині.

Отже, визначення концентрації АТФ вимагає підтримання постійної концентрації глюкози, що можливо тільки за умов *in vitro* експерименту. У біологічних зразках з невизначеною концентрацією глюкози, вимірювання не може бути виконане за допомогою лише одного двоферментного біосенсора, оскільки відгук залежить від обох субстратів - як від глюкози, так і від АТФ. Проте, це можна реалізувати, використовуючи два біосенсори – один на основі ГОД, другий – на основі ГОД/ГК. При цьому один сенсор дає інформацію відносно концентрації глюкози, другий визначає різницю між відгуками до глюкози і АТФ; таким чином, концентрацію АТФ можна визначити, одночасно використовуючи дані, отримані з двох мікробіосенсорів.

4.2.1.3. Дослідження чутливості біосенсора на основі ГОД/ГК до АТФ

Насамперед, в роботі вивчали характеристики розробленого двоферментного біосенсора у модельних розчинах. Типові відгуки мікробіосенсора на основі ГОД/ГК до глюкози і АТФ наведені на рис. 4.32. 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 фосфату, АДФ і АМФ) до вимірювальної комірки показало, що відгуки мікробіосенсора на АТФ прямо залежать від концентрації АТФ.

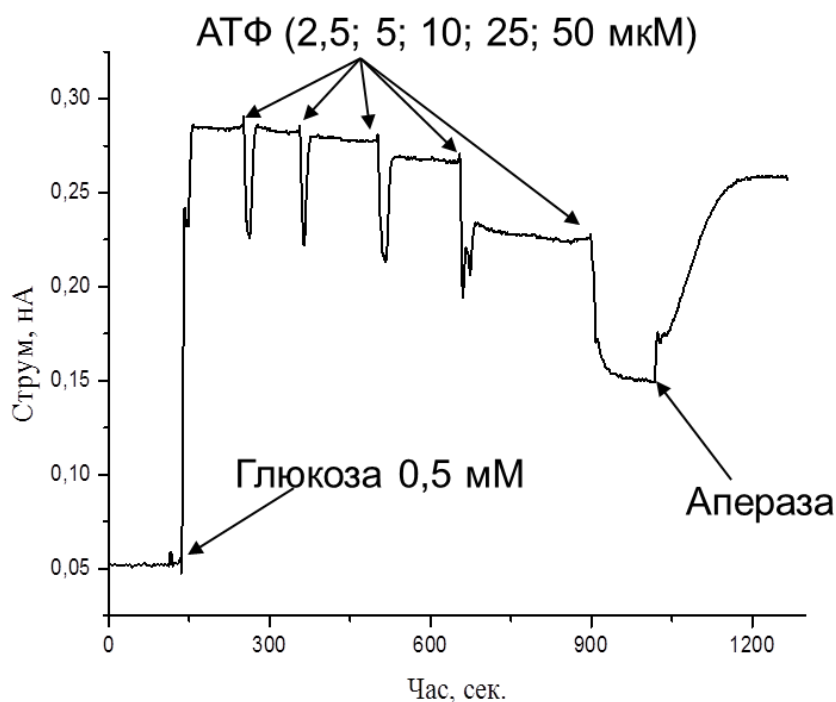


Рис. 4.32. Типові відгуки двоферментного мікробіосенсора на додавання глюкози, АТФ та аперази. Вимірювання виконували у 25 мМ НЕРЕС-буфері, рН 7,4, при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Калібрувальна крива (рис. 4.33), розрахована для вимірювань АТФ з використанням даних рис. 4.32, демонструє можливість вимірювання АТФ, починаючи з концентрації 2,5 мкМ.

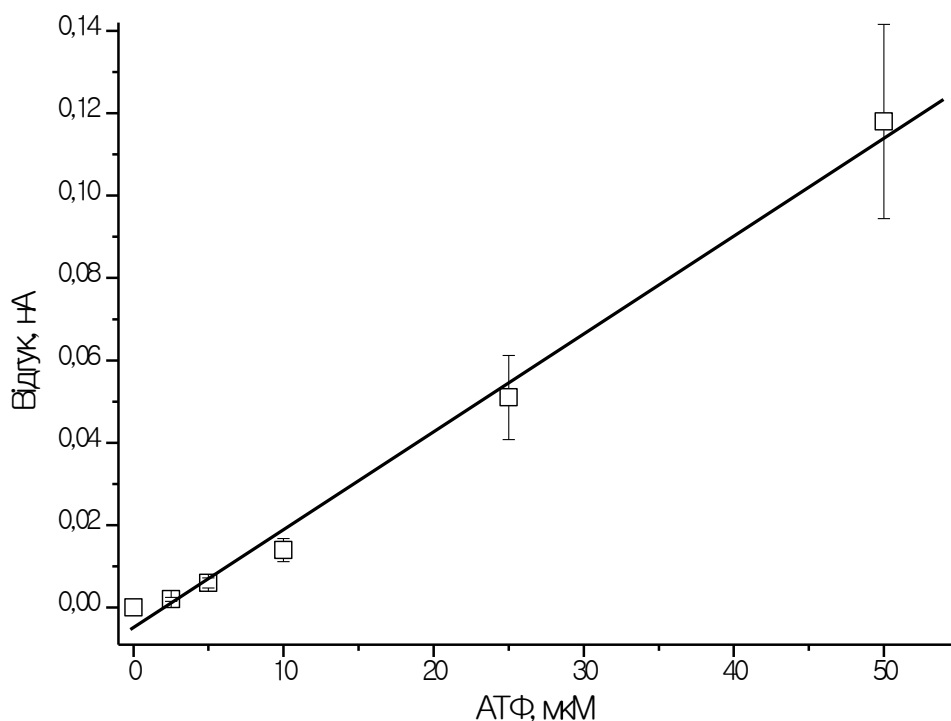


Рис. 4.33. Калібрувальна крива біосенсора для визначення АТФ. Вимірювання виконували у 25мМ НЕРЕС-буфері, рН 7,4, при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

4.2.1.4. Вплив рН на роботу біосенсора на основі ГОД/ГК

Наступним етапом роботи було вивчення рН-залежності величини відгуків двоферментного мікробіосенсора до обох субстратів (глюкози і АТФ). Дослідження виконували у мультикомпонентному буфері, що характеризувався ідентичною буферною ємністю у широкому діапазоні рН

[254]. Використання такого буфера в цих експериментах, пояснювалося необхідністю запобігти впливу буферної ємності на функціонування ферментів за різних значень рН.

Отримані результати свідчать про слабку рН-залежність відгуку сенсора на глюкозу з оптимумом близько рН 7,0 (рис. 4.34, крива 1), а для відгуків біосенсора на АТФ рН-залежність була більш вираженою, а крива у формі дзвону мала оптимум за рН 7,4-8,2 (рис. 4.34, крива 2). Це дуже добре узгоджується з інформацією про рН-залежність вільної гексокінази.

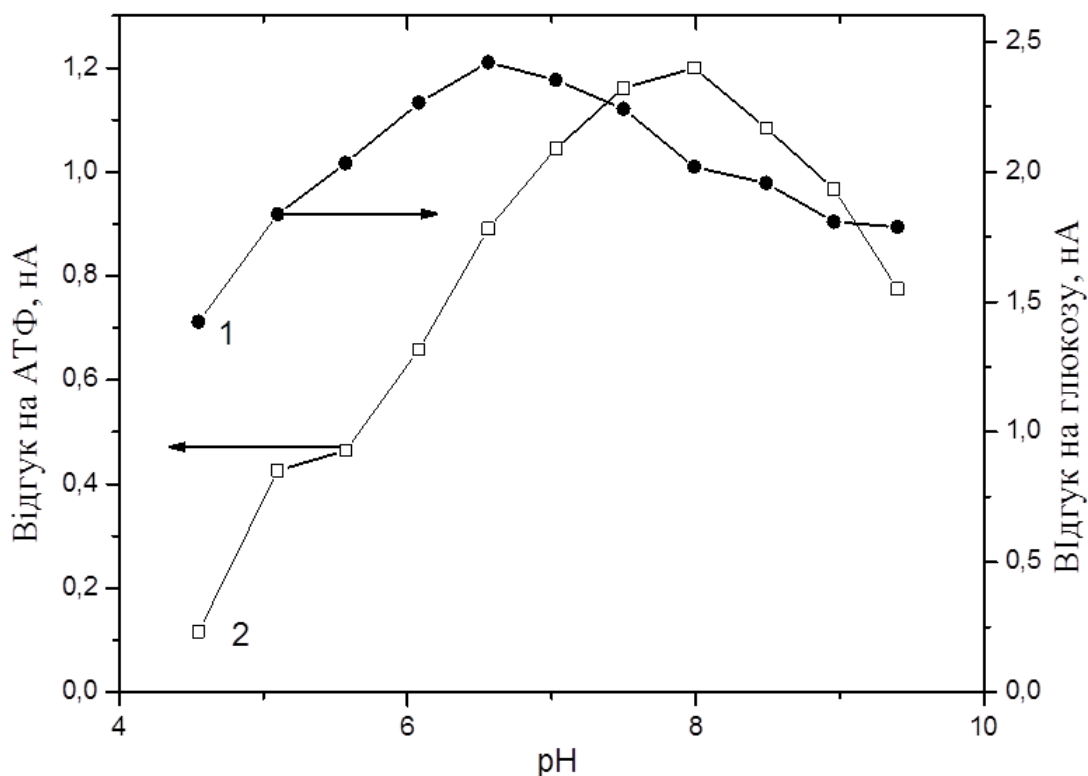


Рис. 4.34. рН-залежність відгуків мікробіосенсора до 0,5 мМ глюкози (1) і 0,5 мМ АТФ (2). Вимірювання проводили в мультикомпонентному буфері при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Оскільки передбачалося, що біосенсор буде застосовуватись для аналізу біологічних рідин, у подальших експериментах використовували 25 мМ HEPES буфер, рН 7,4.

4.2.1.5. Вплив іонів Mg^{2+} на величину відгуків біосенсора на основі ГОД/ГК

Оскільки гексокіназа відома як фермент, залежний від концентрації іонів магнію, що є активаторами цього ферменту ($K_m = 2,6$ мМ для вільного ферменту) [255, 256], було проведено низку експериментів, щоб визначити оптимальну концентрацію іонів магнію для роботи двоферментного мікробіосенсора.

В роботі було встановлено, величина відгуку мікробіосенсора до АТФ сильно залежала від концентрації магнію в аналізованому розчині (рис. 4.35). Збільшення концентрації Mg^{2+} від 0 до 2 мМ спричиняло 4, 5-кратне підвищення відгуків мікробіосенсора на додавання у вимірювальну комірку 500 мкМ АТФ.

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 буферному розчині з 2 мМ Mg^{2+} .

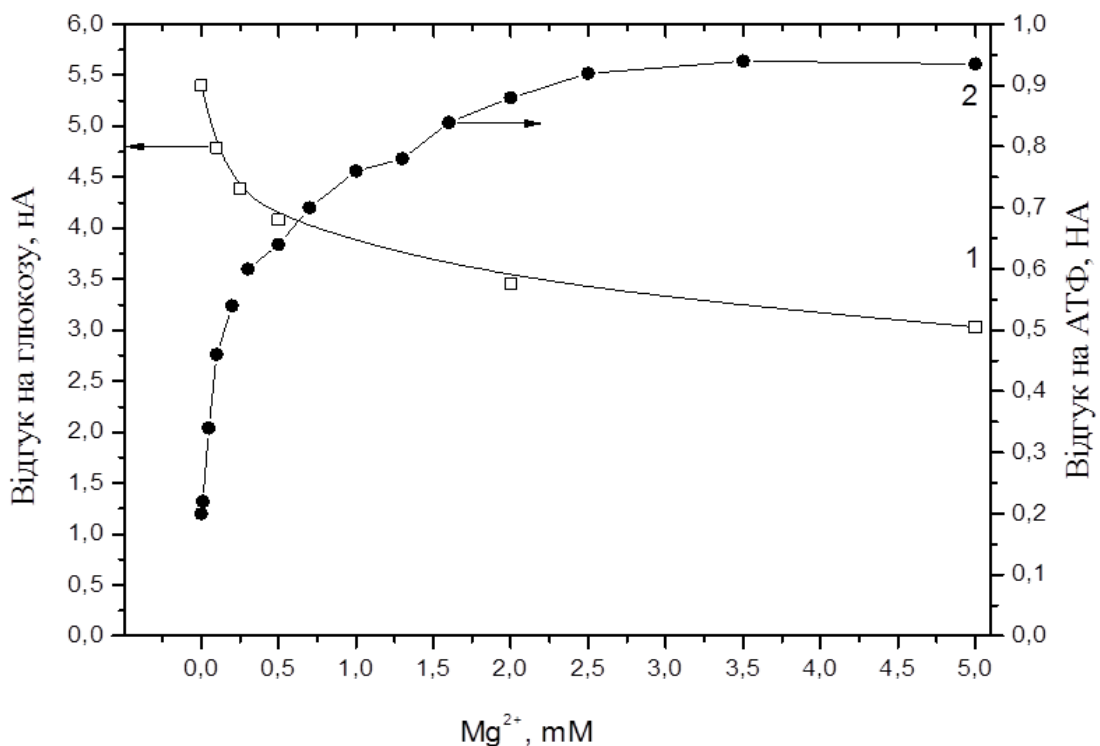


Рис. 4.35. Залежність величини відгуків двоферментного мікробіосенсора на 0,5 мМ глюкози (1) і 0,5 мМ АТФ (2) від концентрації Mg^{2+} . Вимірювання проводили у 25 мМ НЕРЕС-буфері, рН 7,4, при постійному потенціалі +0,6 В відносно $Ag/AgCl$ електрода порівняння.

4.2.1.6. Вивчення залежності величини відгуків мікробіосенсора на АТФ від концентрації глюкози в аналізованому розчині

Робочий буфер з оптимальними значеннями рН і концентрацією іонів магнію був використаний для вивчення залежності відгуків мікробіосенсора на АТФ за різних концентрацій глюкози (рис. 4.36). Нахил лінійної частини калібрувальних кривих і чутливість мікробіосенсора для визначення АТФ були, як правило, однаковими в діапазоні концентрацій глюкози 0,1-1,6 мМ. Хоча, слід відзначити, 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. 4.36 а, крива 5). Це може бути викликане насиченням сенсорних відгуків на глюкозу в концентраціях понад 1,6 мМ (рис. 4.36 б), 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 на глюкозу та, відповідно, підвищеної чутливості до АТФ (див. Рис 4.36 а, крива 5).

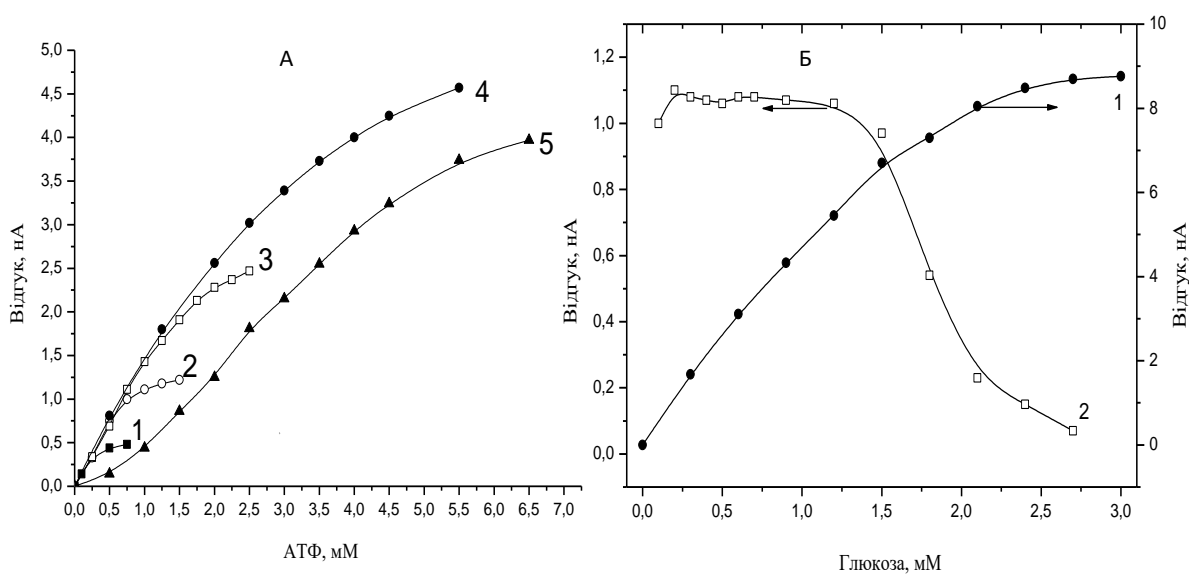


Рис. 4.36. Калібрувальні криві для АТФ біосенсора (А) за різних концентрацій глюкози: 1- 0,1; 2- 0,3; 3- 0,8; 4-1,6; 5- 2,5 мМ. Залежність відгуків мікробіосенсора (Б) від глюкози (1) і від 0,5 мМ АТФ (2) за різних концентрацій глюкози. Вимірювання у 25мМ НЕРЕС-буфері з 2мМ Mg, рН 7,4, при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

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.

4.2.1.7. Дослідження впливу температури на відгуки двоферментного біосенсора

Для порівняння сенсорних відгуків за кімнатної та фізіологічної температури (22 та 37 °С), 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. 4.37). Показано, що при збільшенні температури від 22 до 45 °С відгуки сенсорів до глюкози та АТФ збільшуються. Підвищення температури від 22 до 37 °С спричиняло збільшення відгуків до глюкози та АТФ майже вдвічі. Проте, за подальшого зростання температури від 45 до 60 °С відгук двоферментного мікробіосенсора на АТФ знижувався майже до нуля, а відгук на глюкозу надалі зростав і лише після 65 °С 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.

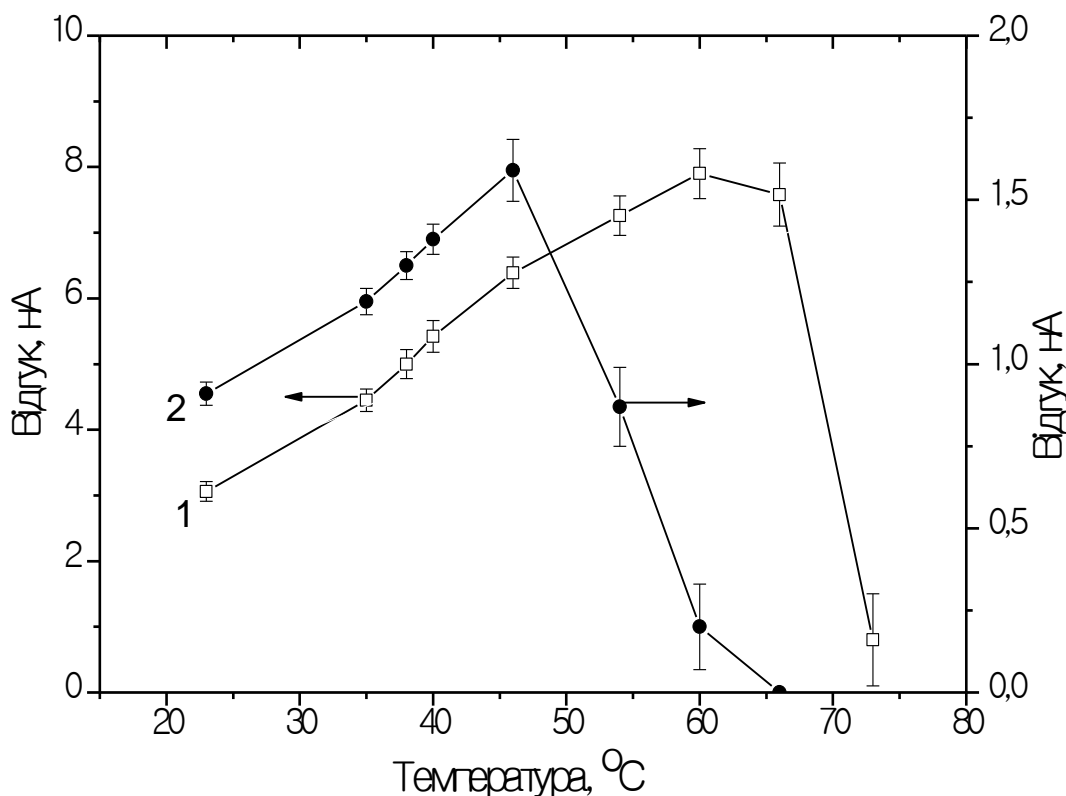


Рис. 4.37. Температурна залежність відгуків мікробіосенсора до 0,5 мМ глюкози (1) і 0,5 мМ АТФ (2). Вимірювання в 25мм НЕРЕС-буфері, рН 7,4, при постійному потенціалі +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

Щодо стабільності двоферментного мікробіосенсора при зберіганні, то відгуки на глюкозу та АТФ не змінювалися принаймні протягом трьох місяців за умов зберігання у сухому вигляді при $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.1.8. Дослідження операційної стабільності та відтворюваності відгуків двоферментного біосенсора

Операційна стабільність та відтворюваність сигналів - важливі характеристики біосенсорів. Було вивчено відтворюваність відгуків

двоферментних біосенсорів на різні концентрації АТФ і глюкози протягом 8-ми годин безперервної роботи (рис. 4.38). Тест на відтворюваність для одного мікробіосенсора представлений на рис. 4.38 а, для кількох мікробіосенсорів - на рис. 4.38б.

Було показано, що впродовж 8 годин безперервної роботи при 25 °С, відгуки одного мікробіосенсора дуже мало змінюються при вимірюванні глюкози та АТФ, тобто відтворюваність є дуже високою. Відтворюваність відгуків біосенсорів для групи з 4 амперометричних мікробіосенсорів є не такою високою, але також достатньою для подальшого їх використання з реальними зразками (рис. 4.38 б).

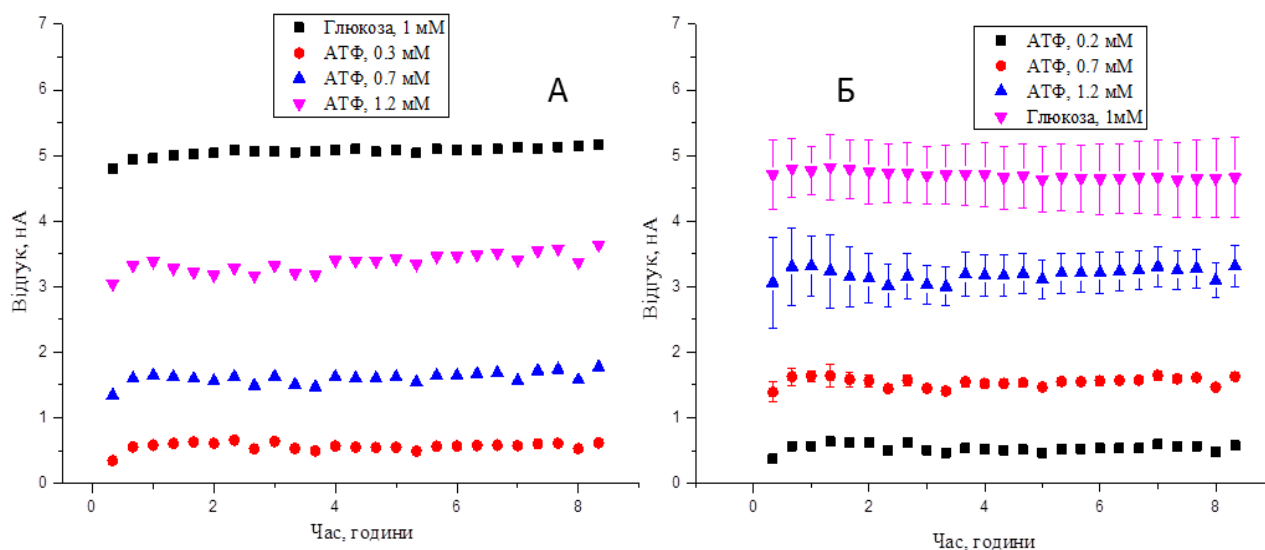


Рис. 4.38. Тест на відтворюваність і операційну стабільність впродовж 8 годин роботи для одного біосенсора, чутливого до глюкози та АТФ (А), і для групи з 4-х біосенсорів такої ж конструкції (Б). Виміри проводили у 25мМ НЕРЕС-буферному розчині з 2мМ Mg^{2+} , рН 7,4, при постійному потенціалі +0,6 В відносно $Ag/AgCl$ електрода порівняння.

4.2.1.9. Дослідження селективності розробленого біферментного біосенсора для визначення АТФ

Селективність також є суттєво важливою характеристикою будь-якого біосенсора. Ця характеристика визначається селективністю перетворювача, з одного боку, і селективністю біоселективного елементу на основі ферменту, з іншого. Селективність платинових електродів, що використовувались в нашому випадку до перекису водню є недостатньою, якщо не застосовувати спеціальні підходи. Необхідна спеціальна модифікація поверхні, оскільки численні електроактивні речовини, що окислюються на поверхні електрода при потенціалі +600 мВ, генерують помилковий електрохімічний сигнал [257, 258]. Саме тому в даній роботі використовували амперометричний перетворювач на основі платинового електрода, вкритого ПФД-плівкою, який був майже нечутливий до наявності в аналізованому середовищі електроактивних речовин (аскорбінова кислота, сечова кислота, аспарагінова кислота, дофамін, цистеїн та ацетамінофен) за фізіологічних концентрацій. Треба відзначити, що плівка з ПФД є достатньо стабільною, а селективність мікробіосенсорів покритих такими плівками до електроактивних інтерферентів залишається незмінною принаймні впродовж 6 годин безперервної роботи [257, 258].

Щодо селективності застосованої ферментної системи, двоферментні мікробіосенсори були протестовані відносно їхньої чутливості до аналогів АТФ (або до речовин з подібною структурою), таких як АДФ, АМФ, ГТФ і УТФ. Практично не було отримано жодної відповіді на вказані інтерференти за їх 500 мкМ концентрації у досліджуваному середовищі, в той час відгук на 500 мкМ АТФ залишився незмінним як за присутності інтерферентів, так і за їх відсутності (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

Вплив можливих інтерферентів на відгуки мікробіосенсорів для визначення глюкози і АТФ

Відгук біосенсора на основі ГОД, нА		Відгук біосенсора на основі ГОД/ГК, нА			
На 0,5 мМ глюкозу без інтерферентів*	На 0,5 мМ глюкозу з інтерферентами*	На 0,5 мМ глюкозу без інтерферентів*	На 0,5 мМ АТФ та 0,5 мМ глюкозу без інтерферентів*	На 0,5 мМ глюкозу з інтерферентами*	На 0,5 мМ АТФ та 0,5 мМ глюкозу з інтерферентами*
3,043±0.045	3,029±0.086	3,026±0,045	1,124±0,023	2,943±0,112	1,149±0,048

Примітки: 1- «*» - інтерферуючі речовини: 0,5 мМ ГТФ + 0,5 мМ УТФ + 0,5 мМ АДФ + 0,5 мМ АМФ + 0,5 мМ аденозин;

Враховуючи отримані результати щодо селективності, можна зробити висновок, що розроблений двоферментний мікробіосенсор за своїми характеристиками є придатним для аналізу АТФ у біологічних зразках. Для вимірювання АТФ у біологічних зразках, що містять глюкозу, необхідно використовувати два біосенсори: на основі глюкозооксидази (глюкозний біосенсор) і на основі глюкозооксидази і гексокінази (АТФ-біосенсор).

4.2.1.10. Порівняння аналітичних характеристик мультиферментного біосенсора для визначення АТФ з відомими сенсорними системами

Порівняльний аналіз аналітичних характеристик розроблених в даній роботі АТФ-чутливих біосенсорів із деякими описаними в літературі біосенсорами, наведено в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7

**Порівняння характеристик розробленого в даній роботі
мультиферментного біосенсора з біосенсорами, описаними в літературі**

Рецептор	Матеріал перетворювача	Час відгуку, хв.	Лінійний/робочий діапазон, мкМ	Межа визначення АТФ, мкМ	Реальні зразки	Джерело
Аптамер	Au	120	0,001-1	0,00025	Сироватка крові людини	[259]
		90	0,005-1	0,0014	Сироватка крові людини	[260]
	СВЕ	30	10 пМ - 100 нМ	10 пМ	Лізат клітин HeLa	[261]
H ⁺ -АТФаза	ІСПТ	1-1,5	200-1000	200	-	[262]
EF ₀ F ₁ -H ⁺ -АТФаза	Au	-	2500-6000	2500	-	[263]
Апіраза	ІСПТ	5	200-1000	200	-	[264]
Холінкіназа	-	1-2	10-75	4	Лізат еритроцитів людини	[265]
ГК + ГФО	Pt	0,3	1,3-12	0,0001	Спори папороті <i>Ceratopteris</i> та коріння <i>Zea mays</i>	[90]
ГЕК	Au	1	15-300	15	Фармацевтичні препарати	[266]
ГОД + ГЕК	СВЕ	0,3	0,5-20	0,2	-	[161]
	Pt	5	0,25-4	0,01	Тканини кишок	[163]
	Pt	2-3	50-500	10	Лізат еритроцитів людини	[159]
	Pt	0,2-0,3	15-90	5	Фармацевтичні препарати	[267]
	Pt	0,2-0,3	Від 2,5	2,5	-	Ця робота

З таблиці видно, що лінійний діапазон визначення АТФ дуже різниться для різних біосенсорів, що значно ускладнює їх порівняння. Біосенсори на основі аптамерів є значно чутливішими у порівнянні з будь-яким біосенсором на основі ферментів (розроблені в даній роботі включно). Чутливості

аптамерних біосенсорів вистачає для визначення АТФ в крові, що неможливо зробити будь-яким іншим біосенсором. Однак, вимірювання за допомогою даних біосенсорів займає багато часу через необхідність тривалої інкубації біосенсора зі зразком - для зв'язування АТФ з аптамером. А це унеможлиблює використання аптамерних біосенсорів для вимірювання концентрації АТФ та *in vivo*, а також в режимі реального часу.

Розроблений в даній роботі біосенсор є в рази чутливішим, ніж біосенсори на основі H^+ -АТФази, EF_0F_1 - H^+ -АТФази та апірази, та приблизно таким же чутливим, як інші біосенсори на основі ферментних систем гліцеролкіназа/гліцерофосфатоксидаза (ГК/ГФО) та ГОД/ГЕК. Процедура аналізу із використанням розробленого мікробіосенсора є нескладною, нетривалою у часі, нетрудомісткою, менш витратною і не потребує попередньої підготовки проб у порівнянні з традиційними методами аналізу АТФ.

Процедура аналізу із використанням розробленого мультиферментного біосенсора є досить простою, швидкою, легкою, досить дешевою і не потребує попередньої пробо підготовки, порівняно з традиційними методами аналізу АТФ. Варто наголосити на економічній ефективності розробленого біосенсора. При виготовленні одного біосенсора витрачається доля мікрограму ферменту, чого цілком достатньо для проведення десятків вимірювань протягом декількох тижнів.

4.2.1.11. Підсумки

Розроблено мікробіосенсор на основі дискового платиного мікроелектрода і коїммобілізованої глюкозооксидази та гексокінази для аналізу концентрацій АТФ. Даний мікробіосенсор дозволяє вимірювати концентрації АТФ з межою визначення 2,5 мкМ, при цьому час відгуку

становить близько 15-20 с. Нанесення ПФД шару на поверхню перетворювача, дозволяє повністю позбутися впливів електроактивних сполук. Крім того, розроблений мікробіосенсор не проявляє чутливості до аналогів АТФ, таких як ГТФ і УТФ. Таким чином, біосенсорний метод є потенційно придатним для вимірювання мікромольних концентрацій АТФ з метою вивчення кінетики процесу споживання або продукування молекул макроергічних трифосфатів.

4.2.2. Біферментний мікробіосенсор для визначення глутамату

4.2.2.1. Вступ

Прямий аналіз вмісту глутамату у мозку є важливим для контролю процесів передачі нервових імпульсів та кращого розуміння процесів виробництва енергії [268], [269]. Рівень цього субстрату у тканинах мозку і біологічних рідинах (кров, спинно-мозкова рідина) строго контролюється гомеостатичним балансом у певному діапазоні і може змінюватись при певній патології. Глутамат, що виділяється на синаптичних терміналях [270–272], відіграє важливу роль у підтримці астроцитарного продукування лактату відповідно до нейронної потреби [269, 273], у стимулюванні синтезу оксиду азоту [269], а також, у сприянні процесам навчання та запам'ятовування [269, 273]. Попри деякі успіхи в галузі *in vivo* моніторингу, визначення концентрацій глутамату у позаклітинній частині мозку, все ще залишається недостатньо вивченим [269, 274]. Відповідно розробка біосенсора для *in vivo* аналізу глутамату є вельми актуальним питанням.

4.2.2.2. Принцип роботи біосенсора для визначення глутамату

Робота глутаматного біосенсора ґрунтується на наступній ферментативній реакції:

ГЛОД



Перетворення глутамату супроводжується накопиченням електрохімічно активного пероксиду водню, що дає можливість визначати концентрацію глутамату за допомогою амперометричних біосенсорів на основі глутаматоксидази.

Оскільки необхідно визначати глутамат на низькому мікромолярному рівні, а амперометричні перетворювачі, навіть модифіковані поліфенілендіаміною мембраною, мають деяку чутливість до аскорбінової кислоти, тому до складу біоселективного елемента біосенсора був включений фермент – аскорбатоксидаза (АОД). Аскорбатоксидаза використовує аскорбінову кислоту, як субстрат, та електроактивний кисень, як косубстрат, і продукує неелектроактивну дегідроаскорбінову кислоту (ДАК) [275].

АОД



Реакція 4.18, що має місце на робочій поверхні перетворювача мінімізує інтерферуючий вплив аскорбінової кислоти.

Не зважаючи на двонаправлену дію оксидази аскорбінової кислоти (як зменшення концентрацій кисню, так і аскорбінової кислоти), сумарний ефект є позитивним.

4.2.2.3. Покращення селективності біосенсора для визначення глутамату

Для перевірки доцільності додавання у біомембрану біосенсора на основі ГЛОД додатково – АОД, було отримано відгуки біосенсорів на глутамат та аскорбінову кислоту. Перевірялась робота двох типів біосенсорів на основі лише ГЛОД та на основі ГЛОД/АОД (рис. 4.39).

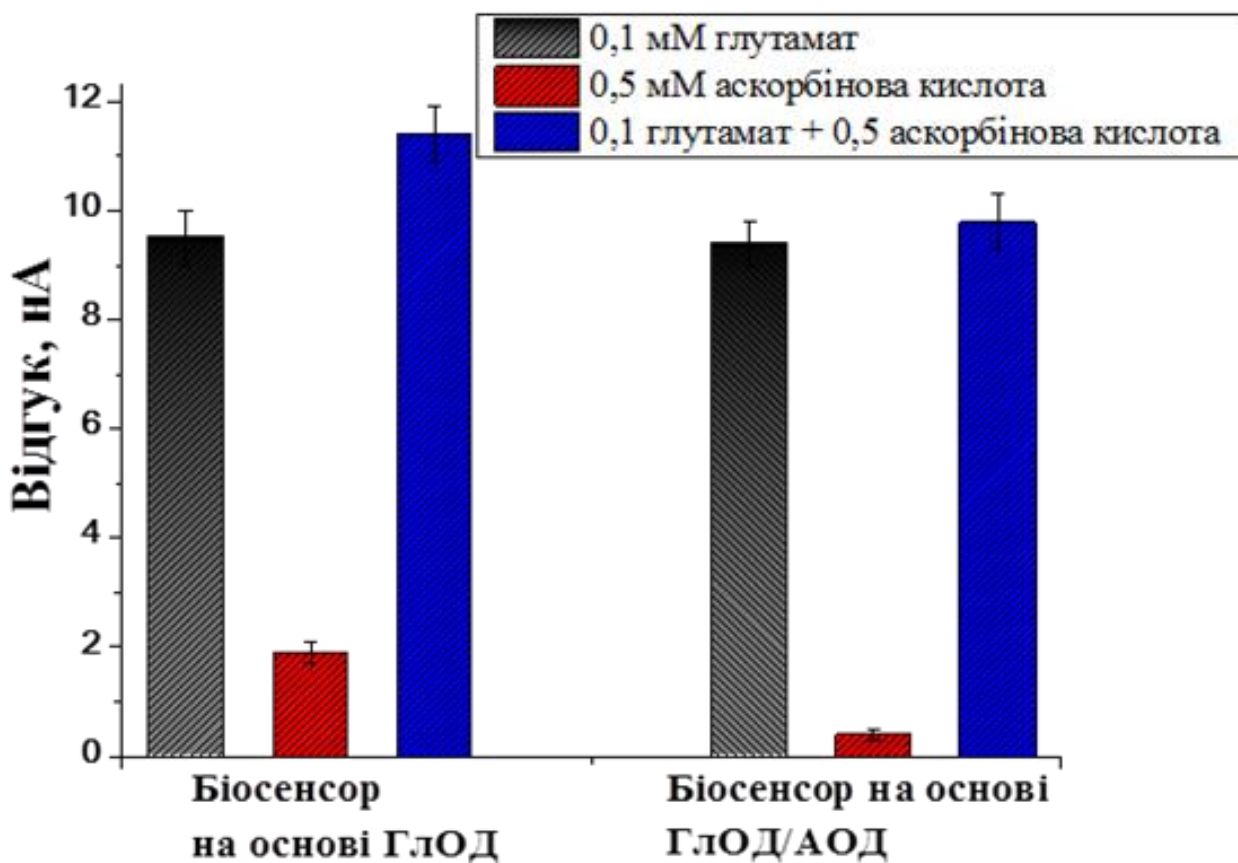


Рис. 4.39. Відгуки біосенсорів на основі ГЛОД та ГЛОД/АОД на додавання у вимірювальну комірку 0,1 мМ перекису водню та 0,5 мМ аскорбінової кислоти. Умови вимірювання: 10 мМ фосфатний буфер (рН 7,4) при постійному потенціалі у +0,4 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, температура 36°C.

Як видно з рисунка, 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 перекис 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.

4.2.2.4. Дослідження чутливості мікробіосенсора до глутамату

Щодо глутамату, можна очікувати його базову концентрацію у тканинах мозку ссавців на рівні 1-5 мкМ [276, 277]. Проте за умов патології, таких як аноксія та ішемія, позаклітинна концентрація глутамату може сягати 80 мкМ [278]. Отже, висока селективність і низька границя визначення є найважливішими аналітичними характеристиками мікробіосенсора, що зумовлюють його придатність для вимірювань глутамату *in vivo* у тканинах мозку.

Аналіз отриманої калібрувальної кривої показав, що розроблений амперметричний мікробіосенсор для визначення глутамату демонструє адекватні характеристики, а саме: лінійний динамічний діапазон до 0,25 мМ з $R=0,9986$ згідно з рівнянням ($I[\text{нА}] = 0,046 + 0,1 * C[\text{глутамат, мкМ}]$). На рис. 4.40 приведена частина калібрувальної кривої, що відповідає низьким концентраціям глутамату.

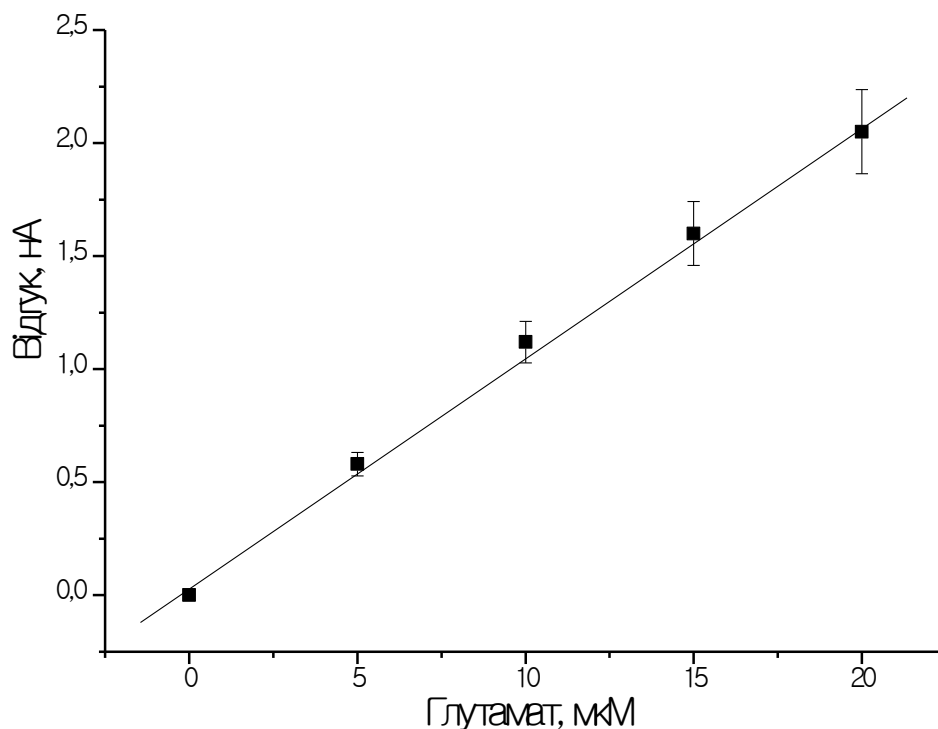


Рис. 4.40. Калібрувальна крива визначення глутамату, отримана для мікробіосенсора на основі вуглецевого волокна, вкритого шаром рутенію, плівкою полі-мета-фенілендіаміну, ГЛОД+АОД та зовнішньою мембраною (50/50 Нафіон і поліуретан). Умови вимірювання: 10 мМ фосфатний буферний розчин (рН 7,4) при постійному потенціалі у +0,4 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, температура 36°C.

З рис. 4.41 можна бачити, що суміші інтерферуєчих 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 (рис. 4.41). Межа визначень мікробіосенсором глутамату становить 2,5 мкМ (сигнал/шум = 3), причому

цей відгук співвідноситься з відгуком на суміш з восьми інтерферуючих речовин, як 2/1.

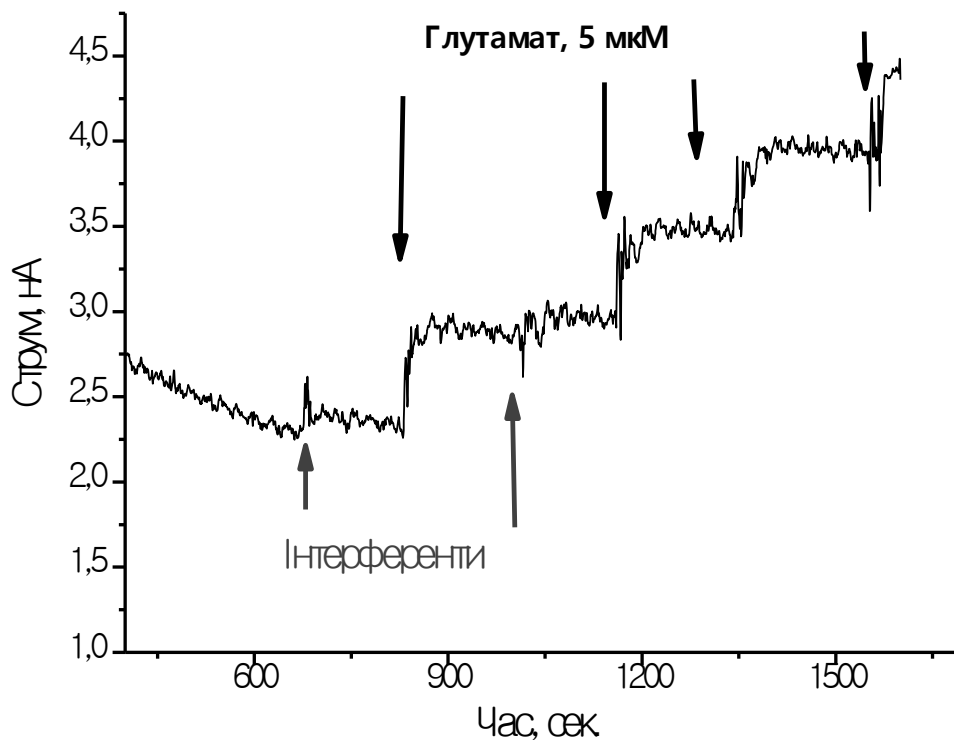


Рис. 4.41. Приклад типових відгуків біферментного мікробіосенсора на глутамат та суміш інтерферуючих речовин. Умови вимірювання: 10 мМ фосфатний буфер (рН 7,4) при постійному потенціалі у +0,4 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, температура 36°C.

4.2.2.5. Дослідження стабільності біосенсора на основі ГЛОД/АОД для визначення глутамату

Стабільність мікробіосенсорів на основі ГЛОД+АОД за безперервної роботи впродовж 10 годин, вивчалась за допомогою безперервних вимірювань в проточній системі. Отримані результати по дослідженню стабільності представлені на рис. 4.42.

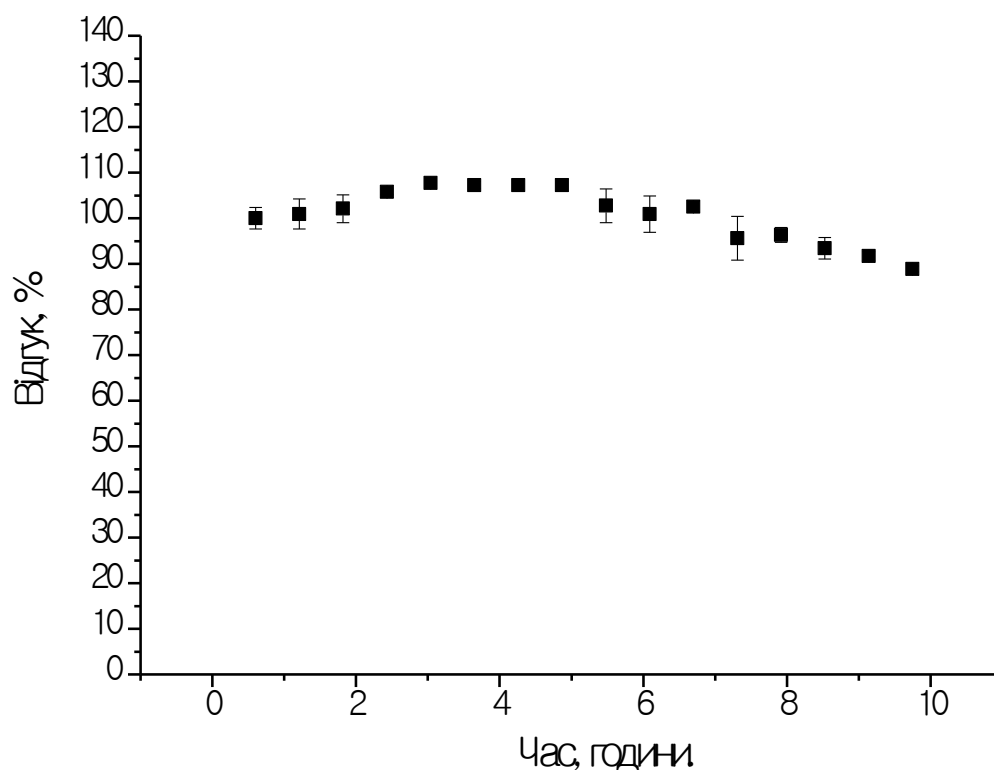


Рис. 4.42. Відтворюваність роботи мікробіосенсорів для визначення глутамату. Умови вимірювання: 10 мМ фосфатний буферний розчин (рН 7,4) при постійному потенціалі +0,4 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, температура 36°C.

При безперервній роботі протягом 10 годин мультиферментні мікробіосенсори характеризувались певною втратою чутливості до глутамату (-15 %). Це, ймовірно, пов'язане з слабкою стабільністю глутаматоксидази. Відповідно, у випадку довготривалого безперервного аналізу із застосуванням такого біосенсора (довше 4-5 годин) буде необхідною процедура його додаткового калібрування.

Також в роботі перевірялась стабільність мікробіосенсора при зберіганні. Досліджувались сенсори за їх зберігання в сухому стані при

температурі +4°C. На 15-й день зберігання мікробіосенсиори мали відгуки на 30 % менші ніж у перший день експерименту.

4.2.2.6. Підсумки

Створено амперометричний мікробіосенсор для визначення глутамату, в якому двоферментна мембрана на основі ГЛОД/АОД відіграє роль чутливого елемента, і вивчено його аналітичні характеристики (селективність, стабільність, лінійний діапазон роботи, мінімальна границя визначення). Показано що додавання до біоселективної мембрани на основі ГЛОД додаткового ферменту АОД значно покращує селективність біосенсора відносно аскорбінової кислоти. Розроблений біосенсор характеризується високою операційною стабільністю та відтворюваністю відгуків біосенсора. Аналітичні характеристики розробленого біосенсора свідчили про перспективність його подальшого використання для визначення концентрацій глутамату *in vivo* в мозку ссавців.

4.3. 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 багато типів мультиферментних біосенсорів. В даному розділі ми розглянемо розробку декількох інших варіантів біосенсорів на основі мультифункціонального використання ферментів. Схематичний вигляд усіх поєднань ферментативних реакцій що були використані для розробки мультиферментних біосенсорів даного типу приведено в додатку Г.

4.3.1. Біосенсор на основі коімобілізованих ГОД з гексокіназою для аналізу активності креатинкінази

4.3.1.1. Вступ

Креатинкіназа (КК) – це внутрішньоклітинний фермент, який у значній кількості міститься у м'язевих клітинах організму людини. У нормі, КК в сироватці крові практично відсутня. Активність КК у крові здорових чоловіків становить 0,038-0,174 од. акт./мл, жінок – 0,026-0,14 од. акт./мл, а у дітей в кілька разів вища ніж у дорослих. Під час тривалих фізичних навантажень, а також, при пошкодженні м'язової тканини (різноманітні запалення, інфаркт міокарду [89, 167], м'язева дистрофії [167]) КК потрапляє в кров, внаслідок чого, її активність у сироватці крові дещо зростає, максимум до 2,0 од. акт./мл [167] або 39-185 нг/мл [279]. Крім того, відомо, що активність КК в сироватці підвищується при гіпотиреозі.

Оскільки, КК є біологічним маркером інфаркту міокарду, то в лабораторній діагностиці активність цього ферменту (або концентрацію) визначають для підтвердження інших симптомів цього захворювання. Встановлено, що у випадку інфаркту, одразу ж починає підвищуватись концентрація КК і перевищує норму вже через 4-6 годин, а максимальна концентрація КК у крові спостерігається через 18-24 години після інфаркту [279]. За рівнем зростання концентрації КК у крові, визначається ступінь важкості інфаркту, що є важливим під час вибору лікування [280]. Слід також зазначити, що визначення концентрації креатинкінази стає в нагоді при оцінці фізичних якостей атлетів [89].

Нашим завданням було розробити мультиферментний біосенсор для визначення активності КК у сироватці крові.

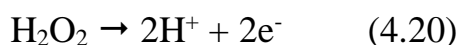
4.3.1.2. Принцип роботи біосенсора для визначення активності креатинкінази

Біосенсорний аналіз активності КК базується на вимірюванні концентрації АТФ за допомогою біосенсора, чутливого до АТФ та глюкози. В основі роботи цього біосенсора лежать ферментативні реакції, що протікають одночасно (4.19 і 4.21) та реакція окиснення пероксиду водню (4.20) на поверхні робочого електрода при прикладанні робочого потенціалу (+0,6 В). В результаті такого окиснення генеруються електрони, які, в свою чергу змінюють силу струму, та реєструються за допомогою амперометричного перетворювача. Наявність КК у досліджуваному зразку спричиняє реакцію відновлення концентрації АТФ (4.22).

ГОД



+ 600 мВ



ГК



КК



В умовах наявності глюкози та відсутності інших субстратів на поверхні електродів відбуваються лише реакції (4.19) і (4.20). В такому випадку, величина відгуку біосенсора є пропорційною до концентрації глюкози. В разі додавання АТФ до робочої комірки, відбувається реакція за участю гексокінази (ГК) (4.21), що призводить до зниження концентрації глюкози, внаслідок чого зменшується і відгук біосенсора на глюкозу пропорційно до концентрації АТФ.

При внесенні КК та її субстратів до робочої комірки запускається реакція 4.22. Нові молекули АТФ генеруються внаслідок фосфорилування АДФ, і величина відгуку біосенсора зменшується пропорційно до швидкості утворення АТФ за рахунок споживання ГК більших концентрацій АТФ і глюкози. Концентрація АТФ у робочій комірці поступово зростає, що в свою чергу спричиняє поступове зменшення сигналу біосенсора. Отже, концентрація КК визначається за допомогою вимірювання швидкості формування АТФ. Відомо, що КК також каталізує реакцію утворення АДФ і креатинфосфату з АТФ та креатину, яка протікає при рН 9,0 [281].

Отримані відгуки мультиферментного біосенсора на послідовні внесення у вимірювальну комірку аліквот креатинфосфату, АДФ, глюкози, АТФ і КК представлені на рис. 4.43.

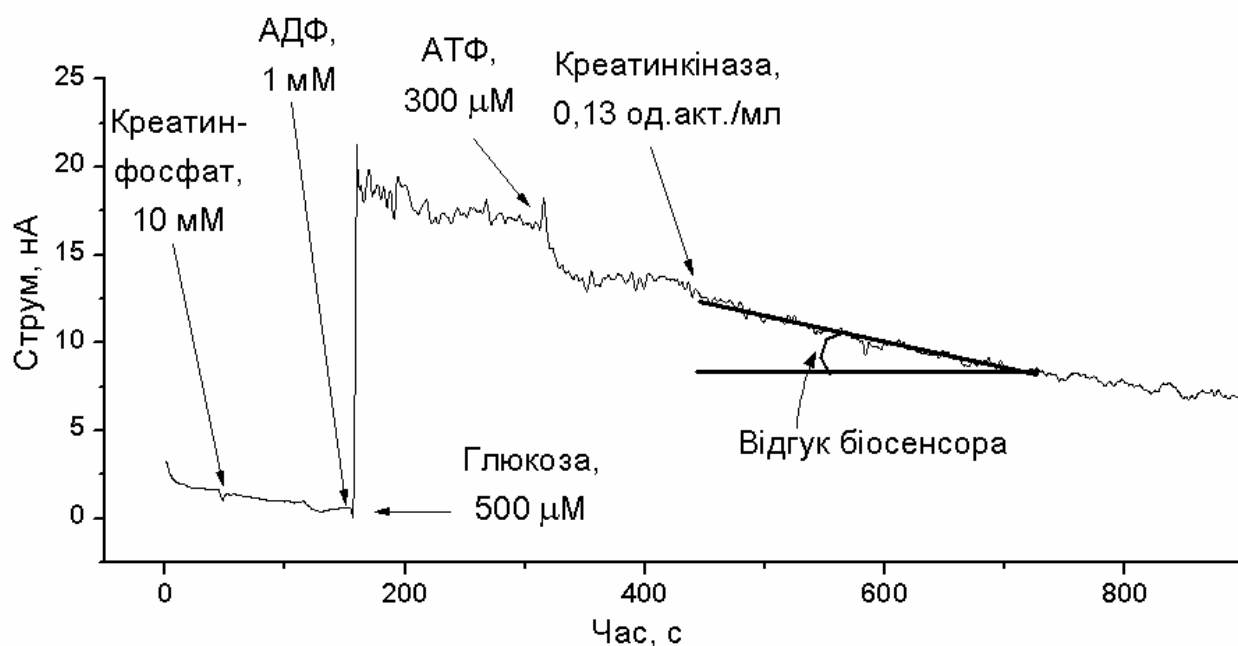


Рис. 4.43. Типові відгуки мультиферментного біосенсора на послідовне внесення субстратів та КК (концентрації зазначені на рисунку). Вимірювання проводили у 10 мМ HEPES буферному розчині, рН 7,4, з 10 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння.

4.3.1.3. Розробка процедури біосенсорного аналізу активності КК у сироватці крові

Розроблений в роботі біосенсор є чутливим до двох субстратів – глюкози та АТФ. Тому було побудовано калібрувальні криві для визначення концентрацій обох речовин, що представлені на рис. 4.44.

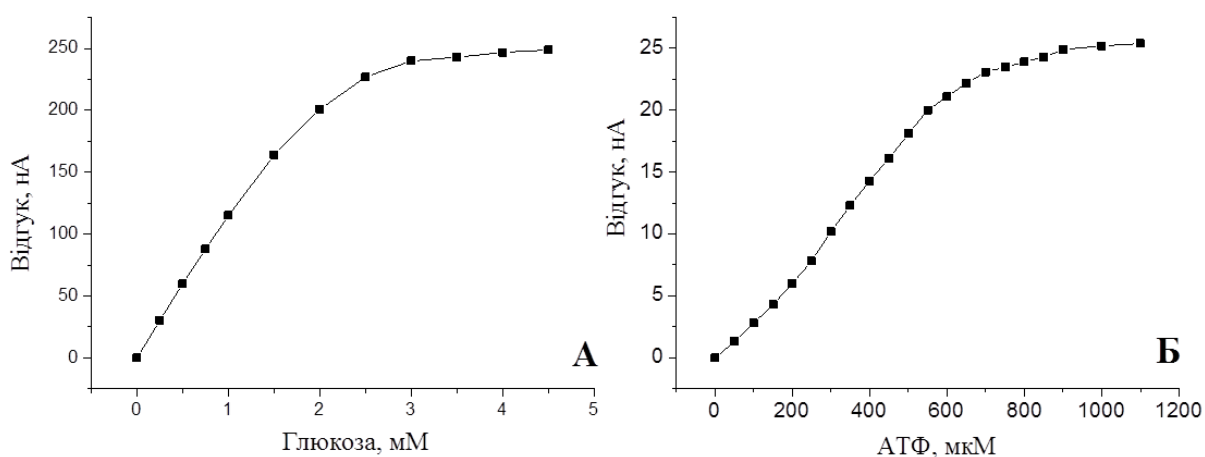


Рис. 4.44. Калібрувальні криві біосенсора на основі ГОД та ГЕК для визначення глюкози (1) та АТФ (2). Концентрація глюкози, за якої будували калібрувальну криву для визначення АТФ, становила 50 мкМ.

В зразках сироватки крові, завжди обов'язково присутня глюкоза. В нормі концентрація глюкози коливається в діапазоні від 4 до 7 мМ (5,5 мМ в середньому), а при патологічних станах може підвищуватись до 15-20 мМ. Отже, в разі розведення зразку сироватки крові у 10-20 разів, концентрація глюкози у вимірювальній комірці складатиме 0,2 - 2 мМ і може бути ефективно визначена розробленим біосенсором, оскільки його відгук на додавання сироватки буде залежати тільки від концентрації глюкози (вміст АТФ у крові лише 1 мкМ, що є нижче чутливості біосенсора). Після

отримання відгуку на глюкозу, необхідно додати АДФ та креатинфосфат для того щоб запустити роботу КК; концентрація АТФ у вимірювальній комірці почне збільшуватись, а величина відгуку – зменшуватись. По швидкості зменшення відгуку, можна буде оцінювати активність КК в зразку сироватки крові. Таким чином, при проведенні одного вимірювання можна визначити концентрацію і глюкози і КК.

Чутливість біосенсора до АТФ, а відповідно, і до КК залежить від концентрації глюкози: збільшення концентрації глюкози призводить до зменшення чутливості до АТФ. Для точного визначення концентрації КК, необхідно побудувати калібрувальну криву для КК при певній концентрації глюкози (наприклад, 250 мкМ) і провести два вимірювання даного зразку. Спочатку потрібно отримати відгук біосенсора на глюкозу і визначити її концентрацію, після чого вирахувати таке розведення зразку, при якому концентрація глюкози в комірці становитиме 250 мкМ. Після отримання другого відгуку на зразок при розрахованому розведенні, отримуємо ту концентрацію глюкози в робочій комірці, при якій побудовано калібрувальну криву, а додавши АДФ і креатинфосфат можна точно визначити активність КК.

Однак, при проведенні клінічних досліджень не обов'язково визначати точну концентрацію КК у крові. Достатньо встановити, підвищено її рівень чи ні, оскільки це дасть змогу, інтерпретувавши інші симптоми, поставити правильний діагноз. Зважаючи на це, наші дослідження були спрямовані на те, аби розробити просту одностадійну методику, яка б визначала підвищення рівня КК в зразку. Для цього необхідно було підібрати таке розведення зразку, яке б найбільш ефективно дозволяло визначати концентрацію КК в межах одного вимірювання. З цією метою, використовували умовний зразок, який містив 5,0 мМ глюкози і 0,35 од.акт./мл КК, що вдвічі більше за нормальну концентрацію в організмі чоловіків. Його додавали у робочу

комірку із розведенням від 6,7 разів до 50 разів, після чого визначали швидкість зменшення відгуку біосенсора на глюкозу після додавання АДФ і креатинфосфату. Результати даного дослідження наведено у таблиці 4.8.

Таблиця 4.8

Вибір оптимального розведення зразків сироватки крові для біосенсорного аналізу активності КК

Розведення зразку	Концентрація глюкози в комірці, мкМ	Активність КК в комірці, од.акт./мл	Відгук біосенсора на глюкозу, нА	Зменшення відгуку, нА за 100 с	Зменшення відгуку, % за 100 с
x6,7	750	0,052	67 ± 17	3,6 ± 1,0	5,3 ± 0,9
x10	500	0,035	46 ± 14	2,9 ± 0,6	6,4 ± 0,6
x20	250	0,017	24 ± 5	1,7 ± 0,5	6,7 ± 0,4
x50	100	0,007	10 ± 2	0,5 ± 0,1	5,0 ± 0,4

Для того, щоб оцінити активність КК, визначали зменшення відгуку біосенсора за 100 секунд після додавання її субстратів; таке зменшення представлено у нА та у відсотках від відгуку на глюкозу. Можна побачити що біосенсор реєстрував активність КК при всіх розведеннях, однак, при розведенні в 50 разів, відгук біосенсора був слабким. Отже, найкращим було розведення зразку в 20 разів, при якому, зменшення сигналу внаслідок продукування АТФ було достатнім для реєстрації біосенсором, а вплив складових зразку на роботу біосенсора був мінімальним через значне розведення. Окрім того, при іншій концентрації глюкози у зразку (3 мМ або 15 мМ), після розведення в робочій комірці буде 0,2 мМ або 0,75 мМ, і як видно з таблиці, біосенсор зможе визначити активність КК при таких концентраціях глюкози.

4.3.1.4. Визначення оптимальної концентрації АДФ та креатин фосфату для роботи біосенсора

КК має два субстрати – АДФ та креатинфосфат (КФ). Тому важливо визначити оптимальні концентрації даних речовин для біосенсорного визначення активності КК. Перш за все були використані такі концентрації АДФ та КФ (5 мМ та 10 мМ, відповідно), які були описані в першій роботі по визначенню активності КК за допомогою АТФ-чутливого біосенсора [167]. Однак, з метою зменшення собівартості аналізу, було вирішено перевірити, яким чином зміниться чутливість біосенсора до КК при зменшенні концентрації субстратів. Залежність величини сигналу біосенсора від КК при різних концентраціях субстратів визначали для трьох концентрацій КК: 0,013 од.акт./мл, 0,038 од.акт./мл та 0,1 од.акт./мл; при 20-кратному розведенні зразку, вказані концентрації відповідали рівню КК, збільшеному в 1,5, 4,5, і 12 разів, що в свою чергу, відповідає всьому діапазону концентрацій КК при патологіях м`язів.

Спочатку було вивчено вплив концентрації АДФ за високої (10 мМ) концентрації креатинфосфату, оскільки ціна на АДФ є в рази більшою, ніж на креатинфосфат (рис. 4.45 а). Було встановлено, що найвищу чутливість до КК біосенсор мав при 1 мМ АДФ, а збільшення концентрації АДФ спричиняло певне зниження чутливості до КК. Такий ефект можна пояснити тим, що АДФ є інгібітором ГК [282]; у випадку ГК із дріжджів, що викривувалась в роботі, інгібування є змішаного типу [283]. Тому при великих концентраціях АДФ, активність ГК зменшується, а разом із тим і знижується чутливість біосенсора до АТФ, яку продукує КК. В подальших дослідженнях активність КК визначали саме при 1 мМ АДФ.

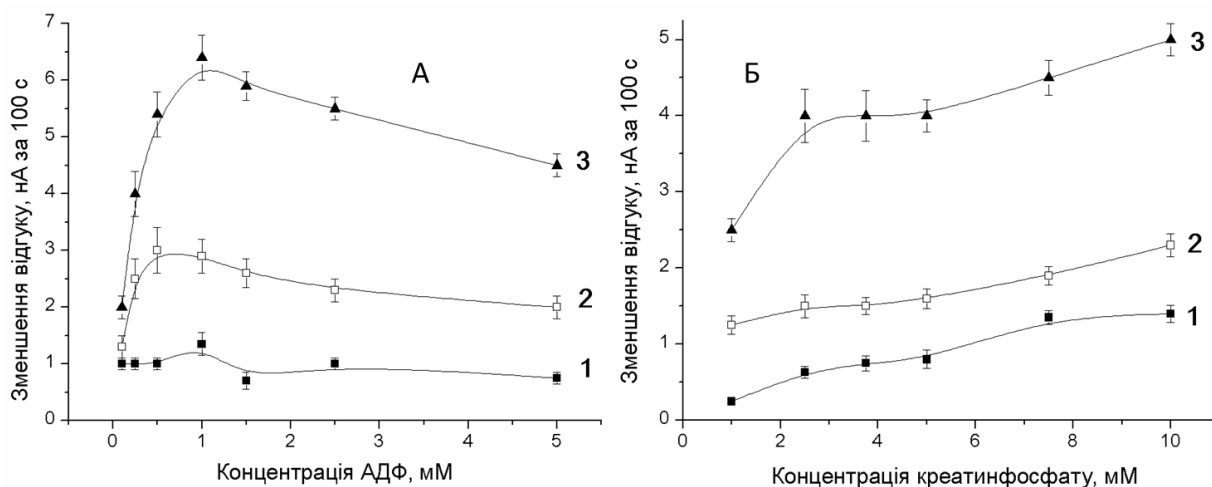


Рис. 4.45. Вплив концентрації АДФ (А) та креатинфосфату (Б) на визначення активності КК (1 – 0,013 од.акт./мл, 2 – 0,038 од.акт./мл, 3 – 0,1 од.акт./мл). Вимірювання проводили в 10 мМ HEPES буферному розчині, рН 7,4, з 10 мМ креатинфосфатом та 10 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння

Зменшення концентрації креатинфосфату призводило до зменшення відгуку біосенсора на КК (рис. 4.45б). Тож, щоб не зменшувати чутливість біосенсора, було вирішено і надалі вносити до робочої комірки 10 мМ креатинфосфату.

4.3.1.5. Аналітичні характеристики біосенсора для визначення КК

Після вивчення оптимальних умов роботи біосенсора були побудовані калібрувальні криві для визначення КК. Як вже зазначалося, біосенсор визначає активність КК за її швидкістю продукування АТФ, а чутливість біосенсора до АТФ залежить від концентрації глюкози у розчині. Через це калібрувальні криві для визначення КК отримували при різних концентраціях глюкози у розчині, які можливі при розведенні зразків сироватки крові у 20 разів (рис. 4.46).

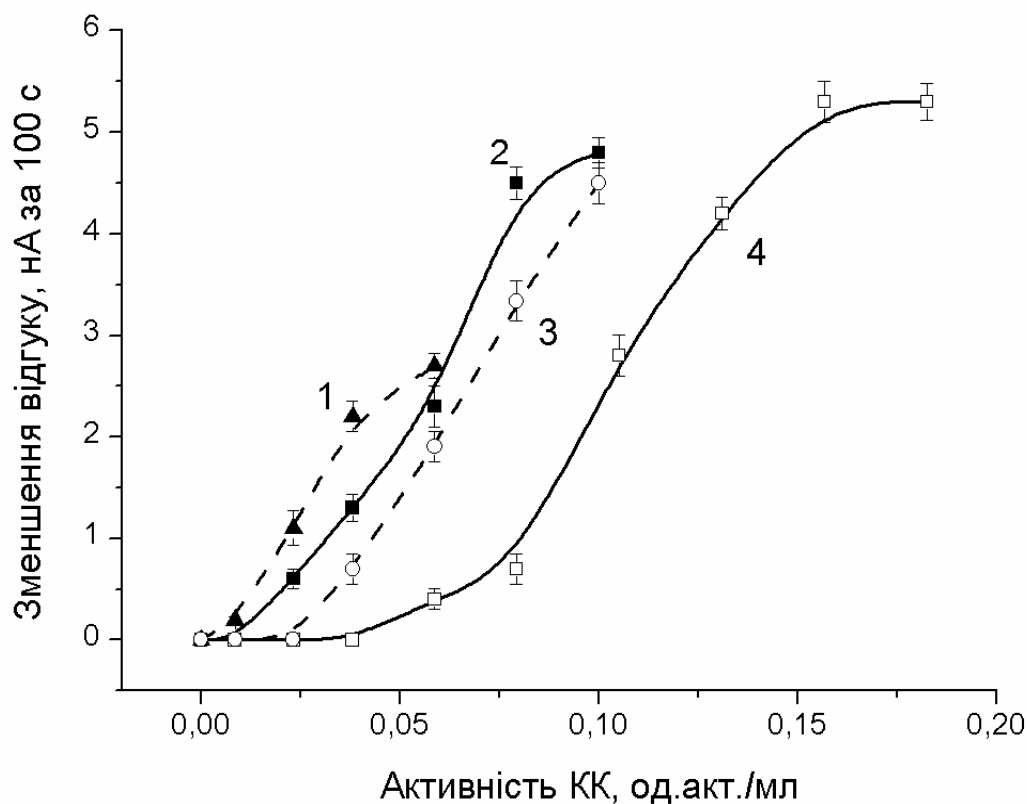


Рис. 4.46. Калібрувальні криві для визначення активності КК, отримані за різних концентрацій глюкози у вимірювальній комірці (1 – 0,1 мМ, 2 – 0,25 мМ, 3 – 0,5 мМ, 4 – 0,75 мМ). Вимірювання проводили в 10 мМ НЕРЕС буфері, рН 7,4, з 1 мМ АДФ та 10 мМ Mg^{2+} , за постійного потенціалу +0,6 В відносно $Ag/AgCl$ електрода порівняння

З рисунку видно, що чутливість біосенсора до КК зменшувалась при збільшенні концентрації глюкози. При концентраціях глюкози 0,1 мМ – 0,5 мМ можна було визначати активності КК від 0,01 од.акт./мл до 0,1 од.акт./мл. При концентрації глюкози 0,75 мМ чутливість біосенсора знижувалась, і відбувався зсув діапазону вимірювання КК у бік більш високих концентрацій (0,06 од.акт./мл – 0,16 од.акт./мл). Отже, чутливості біосенсора було достатньо для визначення підвищення рівня КК у зразку при його 20-кратному розведенні.

4.3.1.5. Перевірка відтворюваності сигналів біосенсора

Відтворюваність сигналів біосенсора є важливою характеристикою, яка вказує на точність проведення аналізу. Тому було досліджено відтворюваність роботи біосенсорів при визначенні основних субстратів – глюкози і АТФ (Рис. 4.47 а), а також трьох концентрацій КК (Рис. 4.47 б).

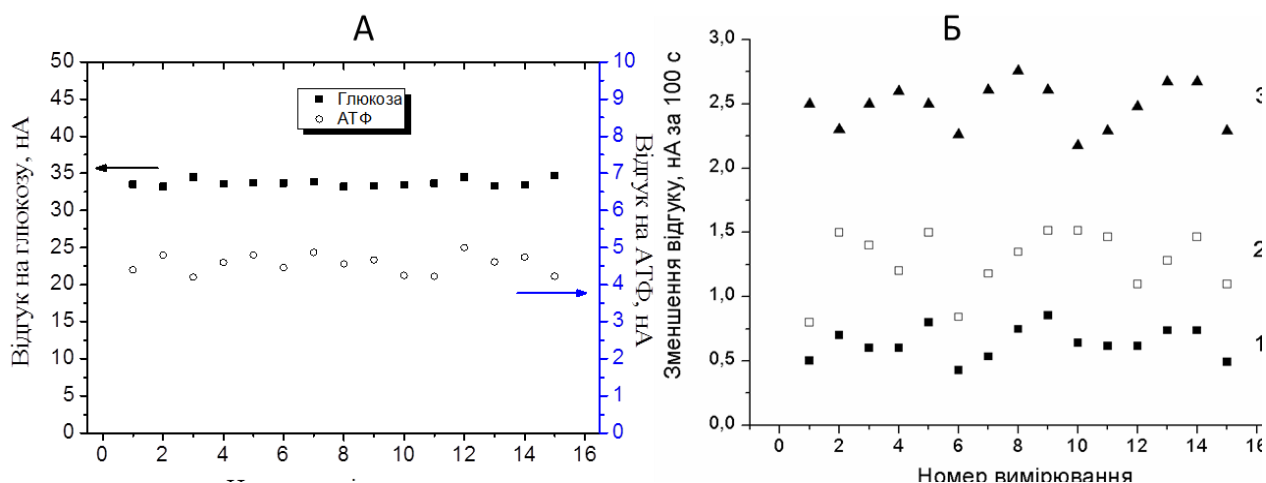


Рис. 4.47. Відтворюваність відгуків біосенсора на глюкозу та АТФ (А) і різні концентрації КК (Б): 0,013 од.акт./мл (1), 0,038 од.акт./мл (2), 0,1 од.акт./мл (3), концентрація глюкози – 0,25 мМ, АТФ – 0,1 мМ

Помітної зміни відгуків біосенсора на усі субстрати впродовж робочого дня не відбувалось, що свідчило про вдалу іммобілізацію ферментів у складі біоселективного елементу. Відносне середньоквадратичне відхилення відгуків на глюкозу складало менше 2 %, а відгуків на АТФ – 5-7 %. Більшу розбіжність відгуків при вимірюванні АТФ у порівнянні з вимірюваннями глюкози можна пояснити тим, що формування відгуку на АТФ відбувається за рахунок конкуренції двох ферментів (ГОД та ГК), які використовують два субстрати (глюкозу та АТФ), в той час як відгук на глюкозу формує лише один ГОД. Більша похибка вимірювання спостерігалась у випадку визначення

КК: відносне середньоквадратичне відхилення відгуків складало 21% при визначенні 0,013 од.акт./мл КК, 19% при визначенні 0,038 од.акт./мл КК, і 15% при визначенні 0,1 од.акт./мл КК. Похибка визначення КК зменшувалась при підвищенні активності КК, оскільки відгук біосенсора на КК зростає.

4.3.1.6. Підсумки

Розроблено амперометричний ферментний біосенсор для визначення активності креатинкінази у зразках сироватки крові. Підібрано оптимальне розведення зразку для аналізу, визначено оптимальні концентрації АДФ та креатинфосфату у робочому розчині. Біосенсор характеризувався достатньою відтворюваністю відгуків при визначенні основних субстратів (глюкози, АТФ та креатинікінази). Біосенсор є придатним для швидкого аналізу активності КК у пацієнтів з підозрою на інфаркт міокарду, або іншими пошкодженнями м'язів.

4.3.2. Мультиферментний біосенсор для визначення ЕДТА, цистеїну та іонів важких металів

4.3.2.1. Вступ

Однією з найбільш гострих екологічних проблем сьогодення - є забруднення навколишнього середовища виробничими відходами [284]. Серед низки забруднюючих речовин, важкі метали та їх сполуки є найбільш поширеними, більшість з яких характеризується високою токсичністю і здатністю до накопичення в живих організмах [285]. Вони масово застосовуються на промислових виробництвах, тому, незважаючи на очисні заходи, вміст сполук важких металів у промислових стічних водах є досить

високим. Тому необхідним заходом є контроль концентрації іонів важких металів.

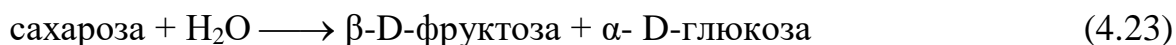
Етилендіамін тетраоцтова кислота (ЕДТА) широко застосовується як хелатуючий агент у багатьох комерційних продуктах, таких як шампуні, завдяки здатності утворювати стабільні розчинні комплекси з іонами металів [286, 287]. ЕДТА використовується і для сприяння поглинанню рослинами поживних речовин, а також у процесах фітоекстракції. Результатом є використання великих обсягів ЕДТА, яка може діставатися водного середовища і спричиняти суттєвий вплив на довкілля не лише через збільшення концентрації цієї токсичної речовини [288–290], а й у результаті підвищеної мобілізації (розчинення) металів з ґрунтів та опадів [291]. Тому є необхідність у розробці ефективних аналітичних методів кількісного визначення ЕДТА у цих середовищах.

Цистеїн - це природна тіол-вмісна амінокислота. Сульфідрильна (-SH) група цистеїну відіграє важливу роль у біологічній активності білків і ферментів [292]. У біологічних рідинах цистеїн є дуже важливим з огляду на свої біологічні та фармакологічні аспекти. Аномальні рівні цистеїну або гомоцистеїну пов'язані з багатьма захворюваннями, такими як уповільнений ріст, хвороба Альцгеймера та серцево-судинні захворювання [293–297]. Підвищені рівні цистеїну або гомоцистеїну вважаються пов'язаними з серцево-судинними захворюваннями [298]. Таким чином, важливо розробити ефективні методи кількісного визначення біотіолів у фізіологічних середовищах.

4.3.2.2. Принцип роботи біосенсора при визначенні іонів важких металів, ЕДТА та цистеїну

В основі роботи біосенсора лежить каскад ферментативних реакцій, що відбуваються в ферментній мембрані:

Інвертаза



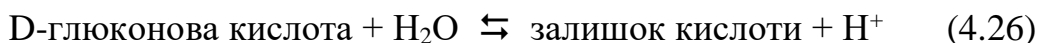
Мутаротаза



ГОД



↓



Інвертаза, мутаротаза та глюкозооксидоза поступово розщеплюють сахарозу до D-глюконолактону, який спонтанно гідролізується до D-глюконової кислоти. D-глюконова кислота дисоціює на залишок кислоти та протон. Це приводить до зміни провідності розчину, яка реєструється з використанням кондуктометричного перетворювача.

Іони важких металів здатні пригнічувати біологічну активність ферментів через взаємодію із сульфгідрильними групами активного центру:



По ходу протікання реакції інгібування відбувається зменшення активності ферментів, що відповідно призводить до зменшення кількості

іонів, утворених під час ферментативного розпаду сахарози. В залежності від величини зменшення активності ферменту можна розрахувати концентрацію іонів важких металів.

Така взаємодія сульфгідрильних груп ферментів з іонами важких металів може бути зворотньою. Відокремлення іонів важких металів відбувається при наявності в реакційній суміші сильних хелатних добавок, таких наприклад як ЕДТА та цистеїн. Вони витісняють іон важкого металу, зв'язаний з залишком серину в молекулі ферменту, відповідно молекула ферменту відновлює свою активність (реактивується) і відновлює свою здатність взаємодіяти з субстратом [192]. Відповідно активність ферментів відновлюється. Мірою величини відновлення активності ферменту може бути концентрація ЕДТА або цистеїну.



Ефективність реактивації сильно залежить від часу реактивації, концентрації реактиватора, та інших параметрів. Отже даний біосенсор можна використати для визначення концентрації реактиватора (ЕДТА або цистеїну).

4.3.2.3. Оптимізація триферментного біосенсора для визначенні іонів важких металів

Першим етапом роботи було визначити необхідну концентрацію сахарози як субстрату при інгібіторному аналізі. Для цього необхідно було обрати концентрацію сахарози, при якій чутливість біосенсора до іонів важких металів буде максимальною. Згідно теорії, оптимальна концентрація субстрату знаходиться в області насичення ферменту субстратом, коли кожна

з молекул ферменту максимально задіяна в процесах перетворення субстрату до кінцевого продукту, що призводить до зміни провідності і генерує максимальний відгук. Проте на різних відрізках калібрувальної кривої може спостерігатися різний рівень інгібування, що також необхідно враховувати. При збільшенні концентрації сахарози до 1,0 мМ ми маємо класичний випадок незалежності рівня інгібування від концентрації субстрату. При подальшому збільшенні концентрації субстрату від 1,0 мМ до 1,5 мМ, починає зменшуватись рівень інгібування (рис. 4.48). Тому в подальших експериментах було вирішено використовувати концентрацію субстрату 1,25 мМ сахарози, при якій відгук біосенсора на сахарозу є найбільшим, але залишається ще досить високий рівень інгібування (чутливість до іонів важких металів).

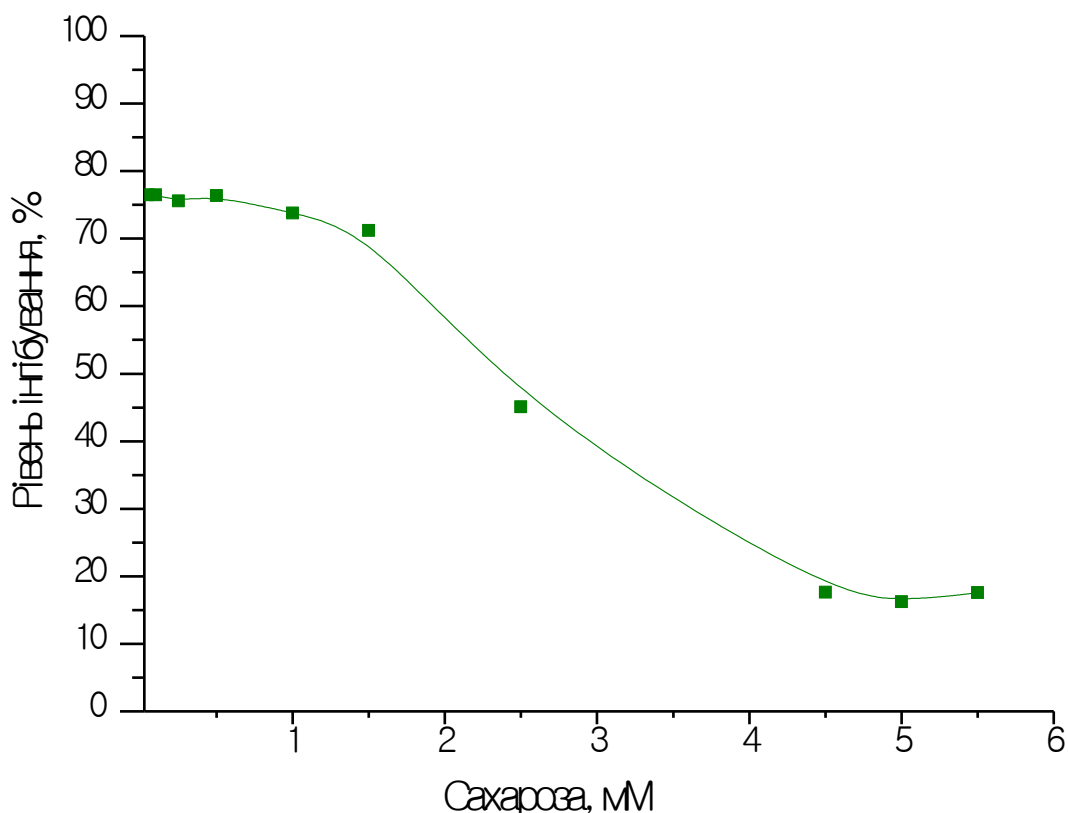


Рис. 4.48. Залежність рівня інгібування біосенсора на основі трьох ферментів від концентрації сахарози. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5, час інгібування 30 хв.

Ще однією важливою характеристикою роботи біосенсора при інгібіторному аналізі є час інкубації біосенсора у аналізованому розчині. Результати дослідження залишкової активності біоселективного елементу на основі триферментної системи в залежності від часу інгібування представлені на рис. 4.49. При проведенні експерименту було вибрано чотири різні концентрації ртуті (10, 25, 50 та 100 мкМ). Як видно з рисунку, для різних концентрацій токсиканту, залежності від часу інкубації також достатньо різні. Крім того, для досягнення найбільшої чутливості біосенсора до токсиканту, необхідно збільшувати час інкубації, а відповідно і загальний час проведення аналізу. Отже оптимальний час інгібування варіюватиме в залежності від концентрації ртуті і буде знаходитись у діапазоні від 10 до 30 хв.

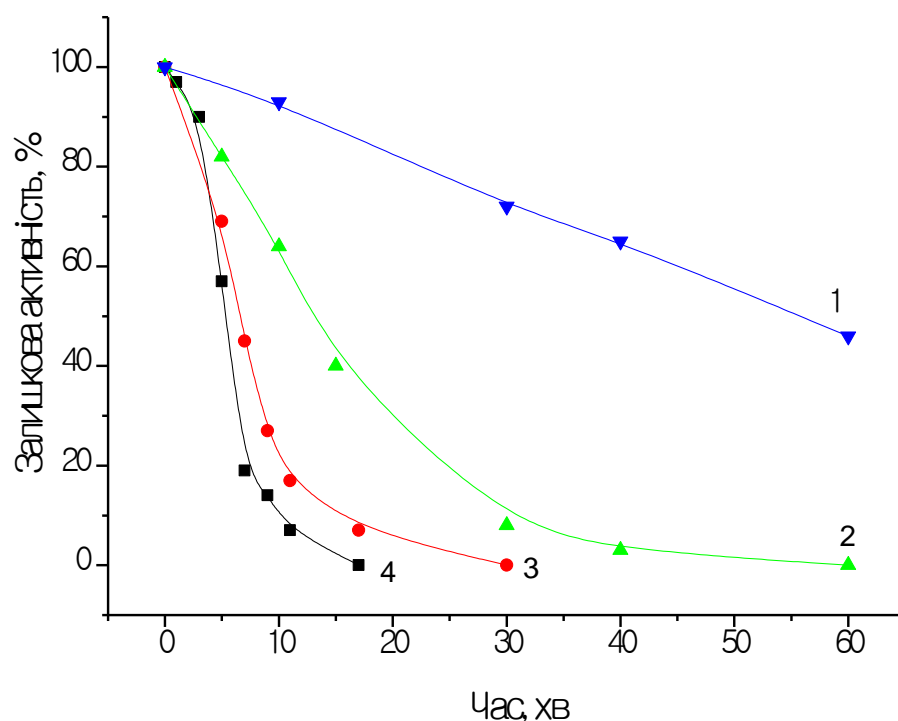


Рис. 4.49. Залежність залишкової активності біосенсора від часу його інкубації у розчинах ртуті: 10 мкМ (1), 25 мкМ (2), 50 мкМ (3) та 100 мкМ (4) (Hg^{2+}). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5, концентрація субстрату – 1,25 мМ сахарози.

Наступним завданням стосувалося дослідження залежності залишкової активності триферментної системи біосенсора від концентрацій різних іонів важких металів. Калібрувальні криві біосенсора для визначення іонів різних важких металів представлено на рис. 4.50. Як видно з рисунку, найсильніше впливали на активність ферментів іони Ag^+ та Hg^{2+} . Інші важкі метали (при концентрації до 100 мкМ) лише незначною мірою впливали на роботу біосенсора. Проаналізувавши 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.

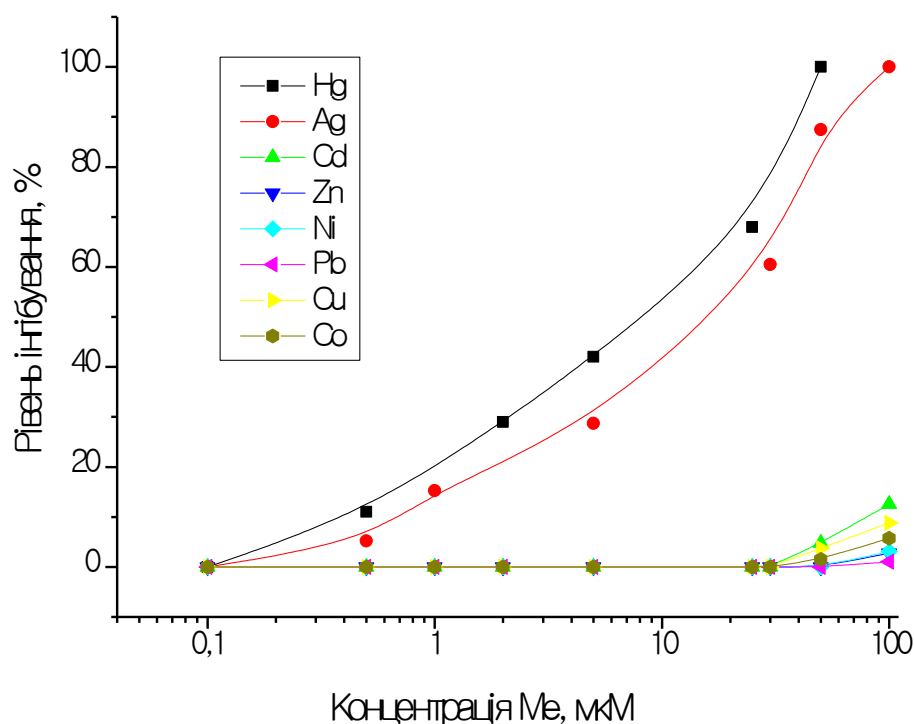


Рис. 4.50. Залежність рівня інгібування триферментної системи біосенсора від концентрації іонів різних металів. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5, концентрація сахарози – 1,5 мМ, час інгібування - 30 хв.

4.3.2.4. Перевірка можливості використання триферментного біосенсора для визначення ЕДТА та цистеїну

З літературних джерел відомо, що в якості реактиваторів ферментних систем біосенсорів для визначення іонів важких металів часто використовують розчини ЕДТА або цистеїну [299], тому для перевірки можливості реактивації розробленого біосенсора було використано розчини 10 мМ цистеїну та 5 мМ ЕДТА з нейтральними значеннями рН. Можна вважати, що величина відгуку на сахарозу пропорційна сумарній активності ферментів біоселективного елемента біосенсора. Тому при проведенні експерименту, спочатку отримували по 2-3 відгуки біосенсора на додавання у вимірювальну комірку аліквот сахарози, далі біосенсор протягом 10-20 хвилин в залежності від концентрації інгібіторів, інгібували розчином ртуті чи срібла (найбільша чутливість розробленого біосенсора саме до цих металів). Після чого знову отримували 2-3 відгуки на ті ж самі концентрації сахарози. Якщо відгук ставав помітно меншим, проводили процедуру реактивації розчинами ЕДТА або цистеїну протягом 45 хв. при інтенсивному перемішуванні (таблиці 4.9 та 4.10).

Таблиця 4.9

Реактивація триферментного біосенсора після інгібування іонами срібла

Залишкова активність біоселективного елемента біосенсора, %	
Після інгібування	Після реактивації в 5 мМ ЕДТА 45 хв.
80	100
70	100
64	95
63	90
40	85
3	3
2	7

Таблиця 4.10

Реактивація триферментного біосенсора після інгібування іонами ртуті

Залишкова активність біоселективного елементу біосенсора, (%)	
Після інгібування	Після реактивації в 10 мМ цистеїні 45 хв
81	100
73	100
40	100
0	83
0	84

Виявилось, що ЕДТА практично не реактивував ферменти після інгібування іонами ртуті. Значно ефективнішою була реактивація біосенсора розчином ЕДТА після інгібування іонами срібла. Цистеїн, навпаки, показав слабку реактивацію ферментів після інгібування іонами срібла та високу реактивацію після інгібування іонами ртуті.

Результати, отримані з реактивації біосенсора ЕДТА та цистеїном, дають можливість зробити висновок, який саме із металів (ртуть чи срібло) та за якої їх концентрації необхідно використовувати при застосуванні даного мультиферментного біосенсора для визначення концентрації ЕДТА або цистеїну.

4.3.2.5. Аналітичні характеристики біосенсора для визначення ЕДТА та цистеїну

Далі було побудовано калібрувальні криві триферментного біосенсора для визначення ЕДТА та цистеїну (рис. 4.51). 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 інгібували до 55% та 65% залишкової активності, відповідно. Біосенсори, що

інгібувались іонами ртуті реактивували різними концентраціями цистеїну, а активність біосенсорів інгібованих іонами срібла відновлювали різними концентраціями ЕДТА.

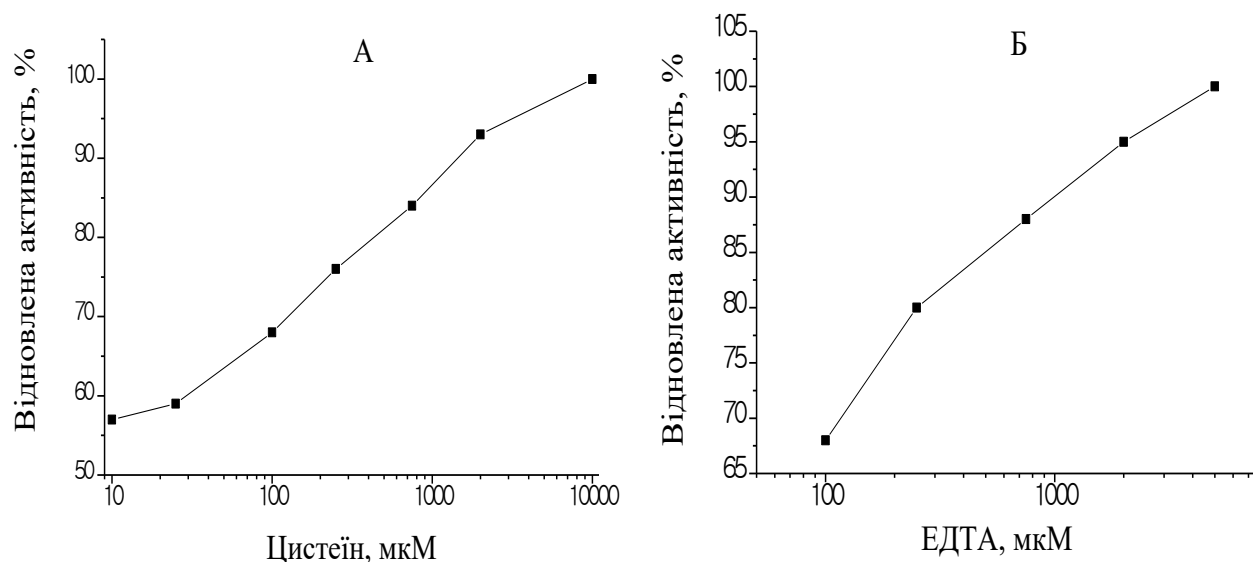


Рис. 4.51. Залежність відновлення активності триферментної системи біосенсора від концентрації цистеїну (а) та ЕДТА (б). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5, концентрація сахарози – 1,5 мМ, час інгібування - 30 хв

Отримані калібрувальні криві характеризувались не дуже широким лінійним діапазоном визначення, але принципова можливість використання данного триферментного біосенсора для визначення ЕДТА та цистеїну була показана. Змінювати чутливість триферментного біосенсора до ЕДТА та цистеїну можливо змінюючи початкові умови інгібування.

4.3.2.6. Підсумки

Підібрано оптимальні умови роботи кондуктометричного біосенсора на основі триферментної системи (інвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза) та

проаналізовано його основні аналітичні характеристики при визначенні концентрацій іонів важких металів. Показано принципову можливість реактивації біосенсора розчинами реактиваторів. Побудовано калібрувальні криві визначення ЕДТА та цистеїну. Експериментально підтверджено можливість використання розробленої біосенсорної системи як аналізатора наявності іонів важких металів, ЕДТА та цистеїну у водних зразках.

4.4. Висновки до розділу 4

В даному розділі дисертаційної роботи 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.

Показано багато прикладів успішних розробок усіх варіантів мультиферментних біосенсорів. Проведено аналіз переваг та недоліків відповідного типу біосенсора, який порівняно як з моноферментними біосенсорами, так і з іншими варіантами мультиферментних біосенсорів.

Звичайно, присутність декількох ферментів у складі біоселективного елементу біосенсора значно ускладнює процедуру розробки біосенсора, а також може негативно впливати на деякі характеристики відповідного мультиферментного біосенсора і параметри його функціонування.

Але основною причиною розробки мультиферментних біосенсорів є неможливість застосування моноферментних біосенсорів для визначення необхідної цільової речовини. Крім того, вибір мультиферментних систем необхідний для досягнення відповідної селективності відносно інтерферентів або високої стабільності біосенсора.

Відповідно, під час розробки нових біосенсорів потрібно враховувати, як можливі позитивні, так і негативні наслідки використання мультиферментних систем в основі біоселективних елементів.

Результати цього розділу опубліковано в працях:

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.
2. 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.
3. **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.
4. **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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.

8. 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.

9. 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.

10. **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.

11. **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.

12. **Soldatkin O.O.**, Peshkova V.M., Saiarina 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.

15. 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.

16. 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.

17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. **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.
24. Книжникова Д.В., Кучеренко І.С., **Солдаткін О.О.** Розробка біосенсора для визначення ацетилхоліну в біологічних зразках. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2018. Т.15. № 2. С. 28-38.

25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
32. Кучеренко І.С., Кучеренко Д.Ю., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В. Солдаткін О.П. Аката Курч Б. Кондуктометричний біосенсор для визначення аденозін-5'-трифосфату: патент України на корисну модель № 103744; заявл. 09.07.2015, опубл. 25.12.2015, Бюл № 24. 7с.
33. Кучеренко І.С., Кучеренко Д.Ю., Солдаткін О.О., Дзядевич С.В. Солдаткін О.П., Касап Б.О., Кірдесілер 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.

РОЗДІЛ 5

ЗАСТОСУВАННЯ МУЛЬТИФЕРМЕНТНИХ БІОСЕНСОРІВ ДЛЯ РОБОТИ З РЕАЛЬНИМИ ЗРАЗКАМИ ТА ВЕРИФІКАЦІЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

5.1. Вступ

Незважаючи на значну активність, направлену на розробку мультиферментних біосенсорів, аналітичне застосування останніх залишається все ж таки обмеженим, оскільки дослідники часто лише показують принципову можливість розробки відповідного біосенсора, без його апробації з реальними біологічними зразками. Це пов'язано з тим, що останній етап розробки, присвячений апробації біосенсора, дуже громіздкий. Відповідно, в подальшому, при спробі налагодження промислових зразків біосенсорів, виникає ряд проблем, пов'язаних з використанням приладів при аналізі реальних зразків. Вирішення цих питань може призводити до зміни конструкції біосенсора, Акових затрат часу та грошей, а іноді, ці проблеми, неможливо вирішити взагалі. Відповідно, ключовим етапом розробки кожного біосенсора, є успішна апробація запропонованого біосенсора при роботі з реальними зразками, що містять цільову речовину.

Тому важливим і обов'язковим етапом нашої роботи, було продемонструвати можливість аналізу реальних зразків з використанням розроблених мультиферментних біосенсорів та провести валідацію результатів традиційними методами визначення.

5.2. Вимірювання концентрації лактози в зразках молока з використанням триферментного біосенсора

5.2.1. Перевірка основних характеристик мультиферментного біосенсора для використання його для аналізу лактози в молоці

Першим етапом необхідно було показати принципову можливість використання розробленого амперометричного біосенсора для аналізу концентрації лактози в зразках молока. Тому необхідно було перевірити основні аналітичні характеристики мультиферментного біосенсора для визначення лактози. Було отримано залежність величини відгука біосенсора від концентрації лактози та побудовано калібрувальну криву визначення лактози (рис. 5.1). Лінійний діапазон роботи біосенсора становив від 0,01 мМ до 1,25 мМ лактози. Мінімальна границя визначення лактози складала 0,005 мМ і була вирахована, як концентрація, що відповідає сигналу біосенсора в три рази більшому за шум базової лінії.

З метою отримання найкращої селективності амперометричних перетворювачів на основі дискового платинового електроду до H_2O_2 відносно електроактивних речовин, була використана методика нанесення додаткової мембрани на основі ПФД [300]. Відповідно, при розробці мультиферментного біосенсора для визначення лактози, використовували амперометричні перетворювачі вкриті ПФД мембраною. Типова калібрувальна крива побудована для біосенсорного визначення лактози приведена на рис. 5.1. Селективність розробленого біосенсора оцінювалася відносно різних інтерферуючих речовин (електроактивних і неелектроактивних). Результати наведені в табл. 5.1. Відгуки біосенсора на внесення можливих інтерферентів були розраховані у відсотках відносно величини відгуку біосенсора на лактозу, що була прийнята за 100%.

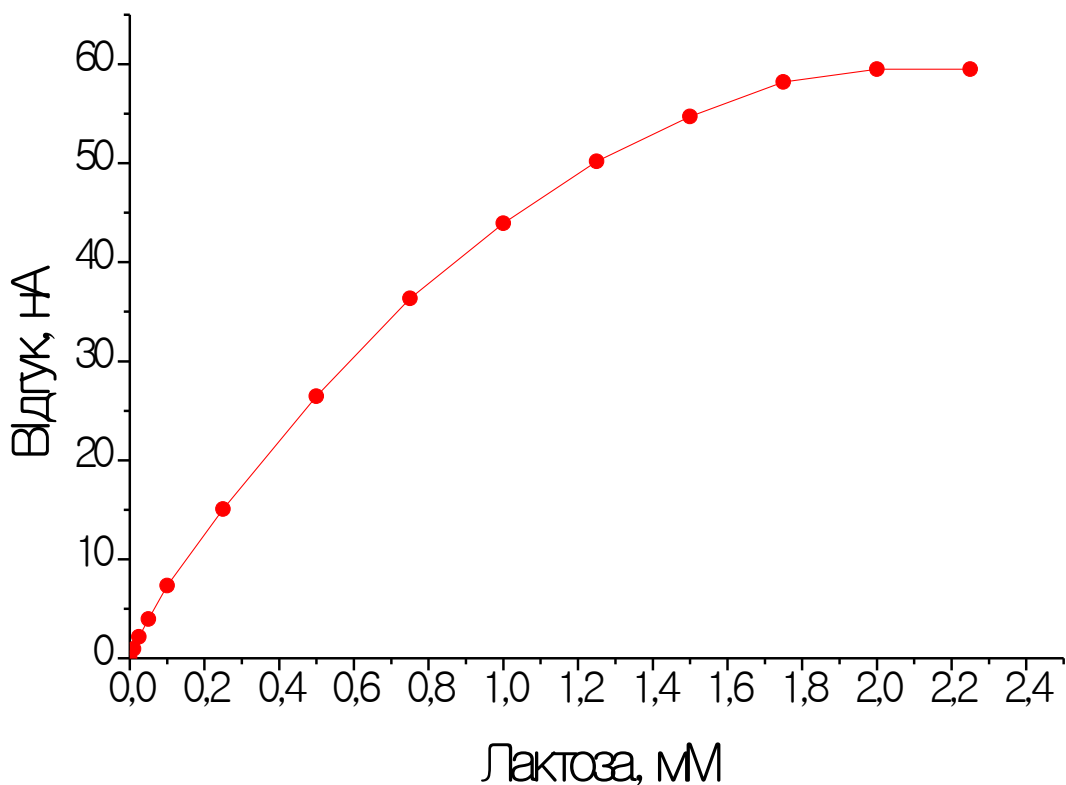


Рис. 5.1. Калібрувальна крива амперометричного триферментного біосенсора для визначення лактози (А). Вимірювання проводились в 10 мМ фосфатному буфері рН=6,5.

Таблиця 5.1

Перевірка селективності біосенсора для визначення лактози

Речовина	Відносний відгук, %
0,25 мМ лактози	100,0
0,25 мМ глюкози	242,3
0,125 мМ лізину	0
0,125 мМ аргініну	0
0,125 мМ гістидіну	0
0,125 мМ аскорбінової кислоти	1,1
0,25 мМ лимонної кислоти	0
0,25 мМ сахарози	0,7
0,25 мМ фруктози	0
0,25 мМ арабінози	0
0,25 мМ галактози	3,5
0,25 мМ сорбітолу	0

Показано деякий незначний вплив на роботу біосенсора аскорбінової кислоти та галактози. Також розроблений лактозний біосенсор був чутливий до глюкози через наявність глюкозооксидази у складі ферментної мембрани. Щоб вирахувати вплив глюкози, можна використовувати додатковий глюкозний біосенсор на основі одного ферменту - глюкозооксидази, яка високоспецифічна тільки для глюкози. Але цей етап наразі не потрібний, оскільки у складі коров'ячого молока глюкоза відсутня.

5.2.2. Вимірювання концентрації лактози в коров'ячому молоці

Для перевірки перспективності використання розробленого триферментного біосенсора на практиці було проведено аналіз зразків молока на наявність в них лактози. В якості контрольного методу використовували традиційний стандартний метод визначення лактози на основі високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Аналіз за допомогою ВЕРХ був люб'язно проведений співробітниками Центрально-східного технічного університету (Анкара, Туреччина).

В ході експерименту, за допомогою біосенсорного методу, у п'яти повторях проаналізовано три зразки коров'ячого молока. Результати біосенсорного аналізу лактози в зразках молока порівнювали з результатами ВЕРХ (рис. 5.2). Як можна побачити з рисунка концентрації лактози в молоці виміряні біосенсором, непогано корелювали з концентраціями виміряними традиційним методом. Коефіцієнт кореляції становив 0,93.

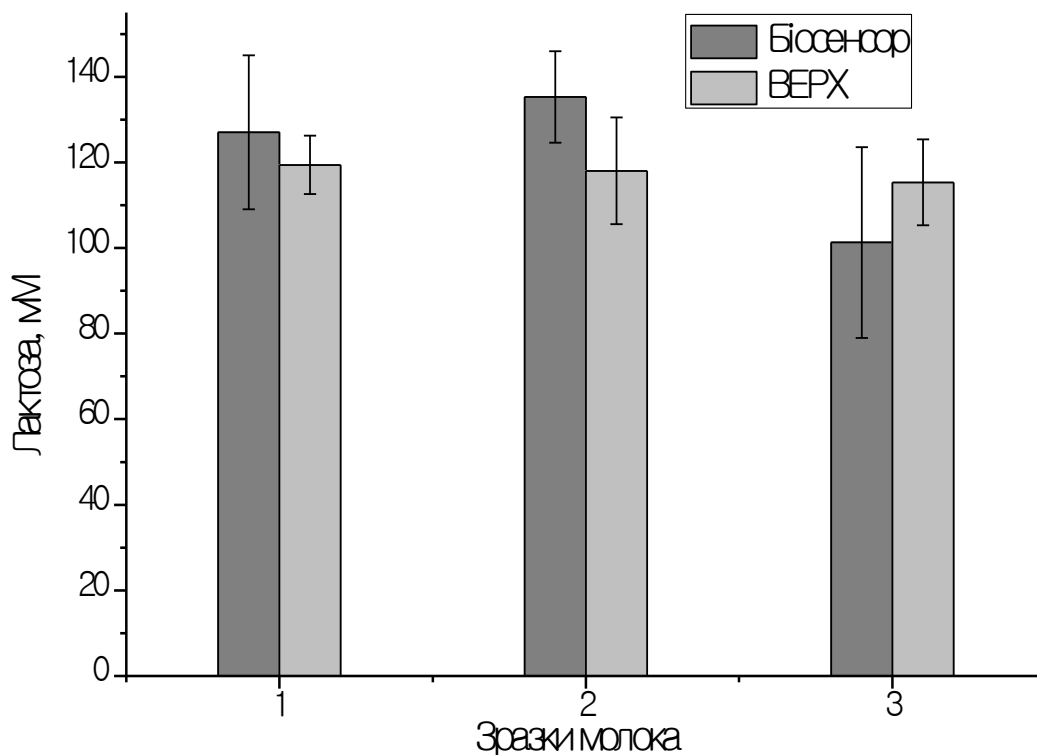


Рис. 5.2. Результати визначення концентрації лактози в зразках молока, отримані триферментним біосенсором та методом ВЕРХ.

Відповідно, розроблений лактозний біосенсор на основі трьох ферментів підходить для швидкого, селективного, недорогого, чутливого та простого визначення лактози в зразках молока.

5.3. Вимірювання концентрації аргініну в зразках лікарських препаратів з використанням двоферментного біосенору

5.3.1. Перевірка аналітичних характеристик двоферментного біосенсора для визначення аргініну в реальних зразках

Розроблений в попередньому підрозділі 4.1.2 двоферментний кондуктометричний біосенсор, за оптимальної його конструкції та з

урахуванням оптимальних умов функціонування роботи, було протестовано при визначенні аргініну у фармацевтичних зразках.

Встановлено, що в оптимальних умовах роботи, при використанні вибраного буферного розчину (5 мМ ТРИС, рН 8,1 з 0,1 мМ Mn^{2+}), нижня межа вимірювання аргініну становила 2,5 мкМ. Лінійний діапазон роботи біосенсора був від 2,5 мкМ до 500 мкМ, чутливість до аргініну становила $13,4 \pm 2,4$ мкСм/мМ. Лінійна ділянка калібрувальної кривої описується рівняннями $\Delta G = 13 \cdot C$ (для визначення аргініну; $R^2 = 0,98$), де ΔG – зміна провідності розчину, після виходу відгуку на плато (мкСм), C – концентрація аргініну (мМ). Слід зазначити, що біосенсорне визначення аргініну в значній мірі залежало від складу біоселективного елементу біосенсора та параметрів буферного розчину. Змінами цих параметрів, можна досягати різноманітних аналітичних характеристик біосенсора, залежно від поставленого завдання.

Далі необхідно було порівняти аналітичні характеристики розробленого біосенсора з характеристиками ферментних біосенсорів, що були розроблені раніше. Для порівняння було обрано низку робіт про біосенсори для визначення аргініну на основі різних електрохімічних перетворювачів та різних ферментних систем.

Результати порівняння приведено в таблиці 5.2. Виявилось, що запропонований в даній роботі біосенсор характеризувався високою селективністю та чутливістю до аргініну, мав широкий лінійний діапазон роботи та був кращим за більшість аналогів.

Таблиця 5.2

Порівняння аналітичних характеристик аргінін-чутливих біосенсорів

Метод вимірювання	Біо-матеріал	Чутливість	Час відгуку, с	Лінійний діапазон, мМ	Селективність, %	Посилання
Потенціометричний	Аргіназа/уреаза	34,7 мВ/декаду	300	0,5–50	Can-100, Arg-100, Val-18, Cys-17, Orn-16, Lys-10	[301]
Амперометричний	Аргіназа/уреаза	$110 \pm 1,3 \text{ А} \times \text{М}^{-1} \times \text{м}^{-2}$	10	0,07–0,6	Can -100, Arg- 95, Pro- 4	[136]
Амперометричний	Пермеабілізовані клітини / уреаза	$14 \pm 1,2 \text{ А} \times \text{М}^{-1} \times \text{м}^{-2}$	60	до 0,6	Arg -100, Can -65, Lys-27, Ser-7, Pro-5	[302]
Кондуктометричний	Аргіназа/уреаза	$4,2 \text{ мкСм} \times \text{мМ}^{-1}$	120	0,01–4	Arg-100, Can-81, His-49, Lys-102, Gly-1, Pro-1, Gln-1, Met-1, Thr-1, Ile-1, Val-1, Pro-1, Ala-1, Orn-1, Ser-1, Cys-1	[135]
Потенціометричний	Інгібування уреазу	Немає даних	300	0,1-2	Arg-100, Gly-76, Val-60, Lys-19, Cys-2, His-2, Pro-2	[303]
Потенціометричний	Аргінін-деїміназа	Немає даних	30	10–6–100	Немає даних	[304]
Кондуктометричний	Аргінін-деїміназа	$64 \pm 3,1 \text{ мкСм} \times \text{мМ}^{-1}$	50	0,03–0,8	Немає даних	[305]
Амперометричний	Оксидаза L- та D-амінокислот	Немає даних	100–200	до 5	Gly-20, Ala-20, Val-35, Leu -112, Ile-45, Ser-35, Thr-27, Asp-14, Asn-22, Glu-29, Gln-28, Lys-34, His-38, Arg-28, Phe-100, Tyr-92, Try-65, Met-133, Pro-32	[306]

Продовж. табл. 5.2

Амперо- метричний	Оксидаза L- та D- амінокис- лот / пероксид- даза	140 ± 2 мкА ×М ⁻¹	50- 100	0,1-1	Try-98, Arg-29, Phe- 49, Met-55, Leu-100, Ser-31, Val-80	[307]
Кондукто- метричний	аргіназа/ уреаза	13,4±2,4 мкСм ×мм ⁻¹	20	0,0025 -0,5	Arg- 100, Met-3, Gln-4, Ala-2, Cys-17, His-14, Gli-4, Lys- 12, Tyr-5, Leu-3, Val-2, Asn-6, Ser-3, Ile-3, Asp-10, Glu-9, Thr-3, Prol-3, Phe- 0, Trp-0	Дана робота

5.3.2. Вимірювання концентрації аргініну в зразках ліків

З метою біосенсорної перевірки концентрації аргініну, було відібрано 6 фармацевтичних препаратів: «Вейрон» (Франція), «Тівомакс» (Україна), «Глутаргін» (Україна), «Тівортін» (Україна), «Бетаргін» (Україна), «Аміноплазмаль» (Німеччина). Для визначення концентрацій аргініну застосовували метод стандартних додавань (див. Матеріали та методи). Дослідження кожного препарату проводили у 7-ми повторах.

За результатами біосенсорного аналізу по шести фармацевтичним препаратам побудовано таблицю 5.3, в якій отримані концентрації аргініну в препаратах порівняно з концентраціями, зазначеними фармацевтичними виробниками.

Далі ми оцінили кореляцію між даними про концентрацію аргініну в деяких лікарських засобах, виміряних біосенсором та заявлених виробниками (рис. 5.3). Коефіцієнт кореляції склав 0,989.

Таблиця 5.3

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

Назва препарату	Концентрація аргініну, зазначена 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

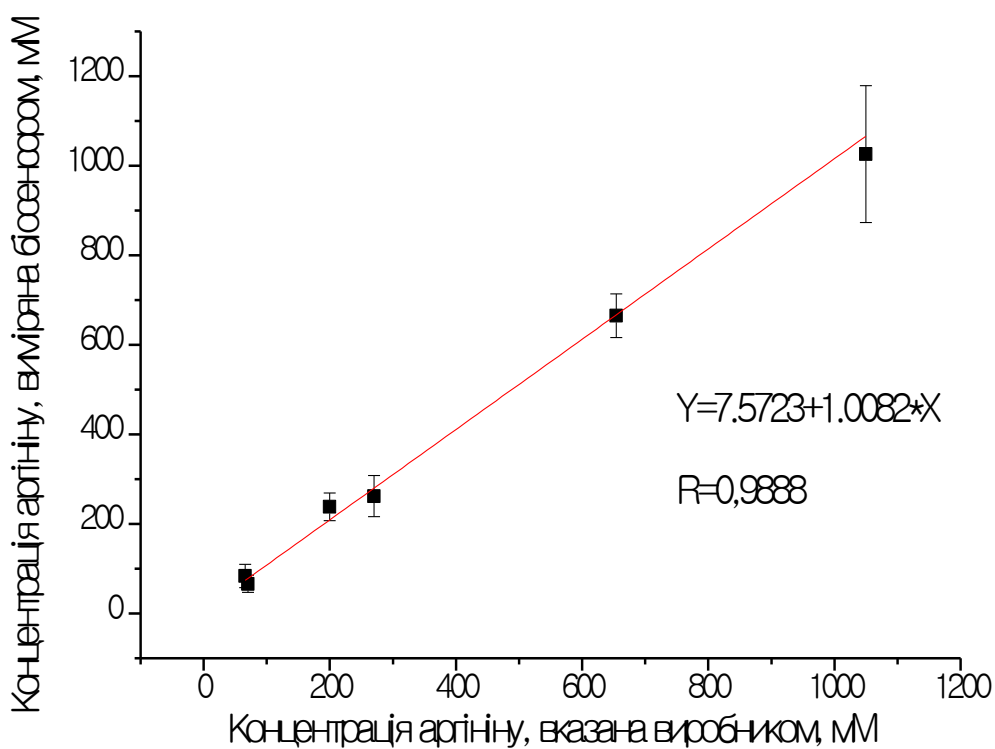


Рис. 5.3 Кореляційний графік результатів біосенсорного аналізу аргініну у фармацевтичних препаратах та концентраціями аргініну задекларованими виробниками ліків. Вимірювання проводились в 5 мМ ТРІС буферному розчині, рН=8,1.

5.4. Аналіз сахарози в реальних зразках напоїв за допомогою біосенсора на основі трьох ферментів

5.4.1. Розробка методики біосенсорного визначення сахарози

Для визначення концентрації сахарози з використанням триферментного біосенсора, існує проблема чутливості даного біосенсора до глюкози (за рахунок ГОД в складі біосенсора). На практиці для вирішення цього питання відокремлення глюкозного вкладу використовують різноманітні схеми, які передбачають попереднє окиснення глюкози в системах проточного аналізу з додатковими реакторами, електродами, або ферментними мембранами перед тим, як вся реакційна суміш досягне чутливого до дисахариду елемента. Конструкції таких систем зазвичай є досить складними, а їх виготовлення вимагає значних затрат коштів і часу.

Але, існує також спосіб, який передбачає використання біосенсорів для визначення даних дисахаридів одночасно з біосенсором, який є чутливим лише до глюкози. Перед початком вимірювання сахарози в реальних зразках будують калібрувальні графіки глюкозного та сахарозного біосенсорів на глюкозу, які відповідають функціям $y = k_{gg} \cdot x$ та $y = k_{sg} \cdot x$ відповідно, та сахарозного сенсора на сахарозу, що відповідають функції $y = k_{ss} \cdot x$ [308]. Схематично, модель такого розрахунку приведена на рис. 5.4.

Концентрацію сахарози в досліджуваному розчині з невідомою концентрацією глюкози можна розрахувати за формулою, окремо, або одночасно використовуючи біосенсори для визначення сахарози і глюкози:

$$[s] = S_s/k_{ss} = (S_{s+g} - G_g \cdot k_{sg}/k_{gg})/k_{ss} = (S_{s+g} - k_{sg} \cdot [g])/k_{ss} \quad (5.1)$$

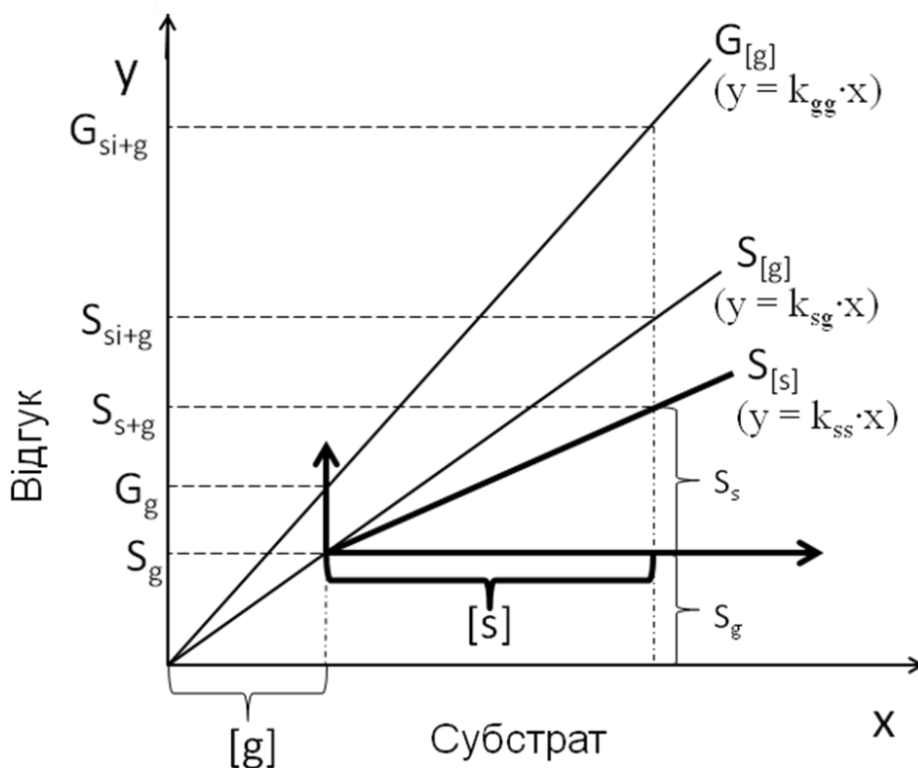


Рис. 5.4. Модель розрахунку концентрації сахарози за допомогою калібрувальних графіків глюкозного сенсора на глюкозу ($G_{[g]}$) та сахарозного сенсора на глюкозу ($S_{[g]}$) та сахарозу ($S_{[s]}$) на конкретному прикладі. S – сахарозний сенсор, G – глюкозний сенсор, s – сахароза, s_i – розщеплена сахароза до глюкози під дією інвертази, внесеної у комірку у надлишку, g – глюкоза, $[g]$, $[s]$ – концентрації глюкози та сахарози (мМ).

5.4.2. Вимірювання концентрації сахарози в зразках соків та меду

Згідно запропонованої в попередньому розділі методики розрахунку за допомогою триферментного біосенсора для визначення сахарози та моноферментного біосенсора для визначення глюкози були проаналізовані 10 зразків фруктових та овочевих соків і нектарів та 2 зразки меду. Результати аналізу приведено в таблиці 5.4. Для аналізу використовували комерційно доступні та одержані прямим віджимом з плодів та коренеплодів зразки

напоїв. Пробопідготовка таких зразків полягала лише в центрифугуванні (в разі необхідності, якщо зразок містив м'якоть плодів) протягом 5 хвилин, при 2400 об./хв. До вимірювальної комірки вносили аліквоту досліджуваного зразку, таким чином, щоб кінцеве його розведення становило 1000 разів. Це дозволяло працювати в межах лінійного діапазону визначення сахарози та глюкози, а також уникати впливу іонної сили розчину, що вносився у вимірювальну комірку. Кожне з вимірювань повторювали щонайменше 5 разів. Таким чином одержували відгуки на внесення кожного зі зразків, після чого, методом екстраполяції на калібрувальній кривій біосенсорів та з використанням методики розрахунків (підрозділ 5.4.1) знаходили значення концентрації глюкози та сахарози у розведених зразках напоїв. 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 методом порівняння були досить близькими між собою (табл. 5.4).

Таблиця 5.4

Порівняння результатів аналізу сахарози в зразках напоїв

Проба	Концентрація сахарози, г/л		Концентрація глюкози, г/л	
	Біосенсор (n = 5)	ВЕРХ (n = 3)	Біосенсор (n = 5)	ВЕРХ (n = 3)
1. Виноградно-яблучний, «Наш сік»	2,76 ± 1,27	5,1 ± 0,13	50,9 ± 3,1	53,7 ± 1,35
2. Яблучно-моркв'яний сік, «Прямо сік»	4,4 ± 1,5	4,1 ± 0,10	7,8 ± 2,5	6 ± 0,15
3. Яблучний сік, «Прямо сік»	7,9 ± 1,44	10,7 ± 0,27	22 ± 1,5	22,3 ± 0,56
4. Томатний сік	1,19 ± 0,65	не виявлено	10,4 ± 1,2	11,3 ± 0,26
5. Яблучний сік	12,42 ± 1,34	12,5 ± 0,31	22,7 ± 2	22,2 ± 0,55

Продовж. табл. 5.4

6. Апельсиновий сік, «Сандора»	$33,66 \pm 3,9$	$37,8 \pm 0,95$	$19,3 \pm 1,8$	$21,6 \pm 0,53$
7. Апельсиновий нектар, «Дооу»	$14,48 \pm 1,16$	$15,85 \pm 0,62$	$54,68 \pm 1,95$	$59,43 \pm 1,41$
8. Апельсиновий сік, «Сарру»	$73,12 \pm 2,05$	$82,77 \pm 0,10$	$11,53 \pm 1,18$	$9,76 \pm 0,09$
9. Яблучний сік, «Pinar»	$14,21 \pm 1,30$	$16,5 \pm 0,14$	$33,33 \pm 1,86$	$36,18 \pm 1,17$
10. Апельсиновий нектар, «Göze»	$6,06 \pm 0,34$	$6,13 \pm 0,03$	$67,56 \pm 1,70$	$70,51 \pm 0,95$
11. Мед квітковий (1)	$8,4 \pm 3,28$	$10,5 \pm 0,26$	$26 \pm 1,4$	$27,1 \pm 0,68$
12. Мед квітковий (2)	$1,3 \pm 4,5$	$2,3 \pm 0,06$	$32,07 \pm 1,8$	$31,3 \pm 0,78$

Отримані біосенсорним методом дані про вміст сахарози та глюкози в продуктах, мали високу кореляцію з даними порівняльного методу ($R = 0,99$), що відображено на рис. 5.5. Це свідчить про великі перспективи використання таких систем для аналізу харчових продуктів на наявність в них відповідних концентрацій сахарози та глюкози, що є важливими показниками харчової цінності продукту, і інколи навіть можуть свідчити про фальсифікацію продукту (фальсифікація соків, меду додаванням цукру тощо).

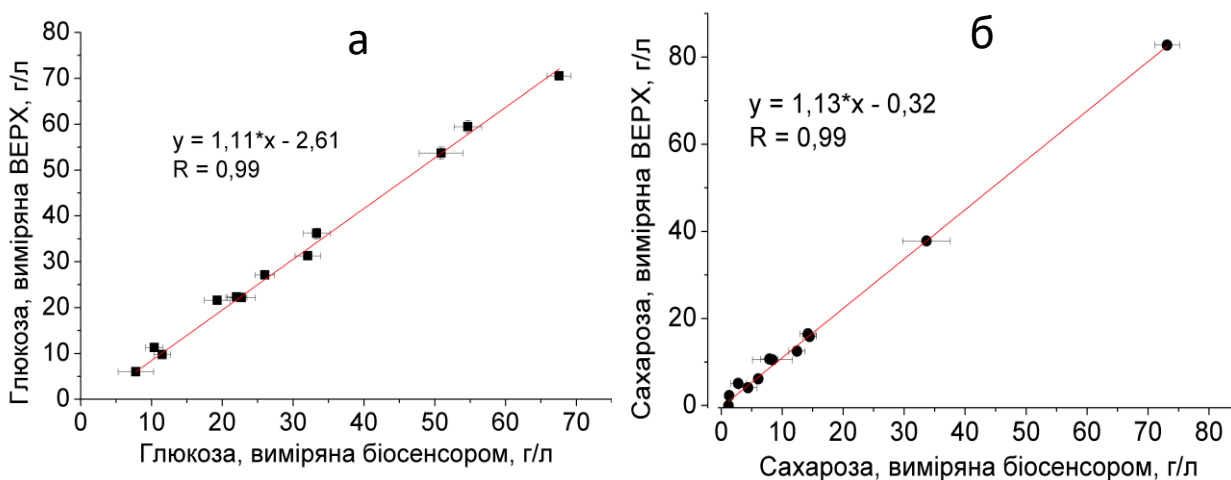


Рис. 5.5. Кореляція результатів визначення глюкози (А) та сахарози (Б) за допомогою мультиферментного біосенсора і ВЕРХ.

5.5. Вимірювання концентрацій іонів важких металів в зразках водойм з використанням біосенсора на основі трьох ферментів

5.5.1. Перевірка селективності триферментного біосенсора для аналізу реальних зразків водойм

Для успішної апробації розробленого біосенсора при роботі з реальними зразками довкілля необхідно було провести перевірку селективності мультиферментного біосенсора відносно різних груп токсикантів, які можуть бути присутні в зразках водойм. В табл. 5.5. представлено рівні інгібування біосенсора на основі триферментної системи різними токсичними речовинами. Як видно з табл. 5.5, наявність у розчині формальдегіду, пестицидів та гербіцидів за 1 мМ концентрації ніяк не впливало на відгук сенсора. Це свідчить про високу селективність розробленого біосенсора відносно інших груп токсикантів.

Таблиця 5.5

Перевірка впливу різних груп токсинів на роботу триферментної системи

Токсини	Концентрація речовини, мМ	Рівень інгібування, %
Іони важких металів (Ag^+ , Hg^{2+})	0,1	100
Пестициди (трихлорфон)	1	0
Гербіциди (карбофуран)	1	0
Формальдегід	1	0

5.5.2. Вимірювання іонів важких металів в зразках водойм

З метою перевірки працездатності розробленого триферментного біосенсора, було вирішено проаналізувати реальні водні зразки на наявність у них іонів важких металів. Для цього було відібрано проби води в ряді

водоймищ м. Києва. Окрім цього, в декілька зразків було 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 багатоконпонентних 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. 5.6).

Таблиця 5.6

Порівняння результатів аналізу водних зразків різними методами

Метод аналізу	Реальні зразки з водойм									
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	№8	№9	№10
АААНg ²⁺ , мкМ	0	0,405 (Hg ²⁺)	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⁺)
Біосенсор, мкМ	0	+	0	0	+	0	0	0	0	++

Примітки: 1 - «+» - перевищення ГДК; 2 - «++» - перевищення ГДК на декілька порядків.

Дослідження проводились за допомогою традиційних методів визначення токсикантів: атомно-абсорбційна спектроскопія (ААС) та атомно-абсорбційний аналізатор ртуті (АААНg²⁺). Як очікувалось, концентрації, що перевищують допустимі величини, виявляються у зразках, до яких навмисно додавалися аліквоти токсину. У решті проб не було іонів важких металів в

небезпечних концентраціях. Що стосується аналізу води з полігону (зразок 10), то наявність концентрації міді, кобальту, цинку та хрому, що перевищують допустимий рівень, було зареєстровано ААС, що збігається з даними, отриманими з мультиферментним біосенсором.

5.6. Використання амперометричних мікробіосенсорів на основі коїммобілізованих ГЛОД/АОД для визначення глутамату в культурі клітин астроцитів

Глутамат - амінокислота, яка виконує роль нейромедіатора, що вивільнюється у синаптичних терміналях [270–272]. Вона відіграє важливу роль у продукуванні лактату астроцитами у відповідь на нейронні сигнали [269, 273, 309]; в стимулюванні утворення оксиду азоту (NO) [269], а також у процесах, пов'язаних з навчанням і пам'яттю [269, 273].

Культура астроцитів з кортексу була взята з мозку новонароджених щурів та культивована до стадії злиття окремих клітин (14 діб). Після того як культура досягала вказаної стадії, астроцити обробляли розчином арабінофуранозиду (в концентрації 8 мкМ) з метою видалення залишків мікроглії.

Для моніторингу секреції глутамату астроцитами було застосовано мікробіосенсор на основі двох ферментів чутливий до L-глутамату (див. розділ 4.2.2). Для контролю селективності отриманого сигналу застосовували 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 до поверхні клітин, але без контакту з ними. Відстань між мікробіосенсором чутливим до глутамату та контрольним сенсором складала близько 100 мкм. Далі проводили механічну

стимуляцію культури астроцитів [188] шляхом торкання поверхні клітин кінцем скляної мікропіпетки. Така механічна стимуляція призводила до секреції L-глутамату клітинами. Отримані результати щодо реакцій біосенсора чутливого до глутамату та контрольного сенсора представлено на рис. 5.6.

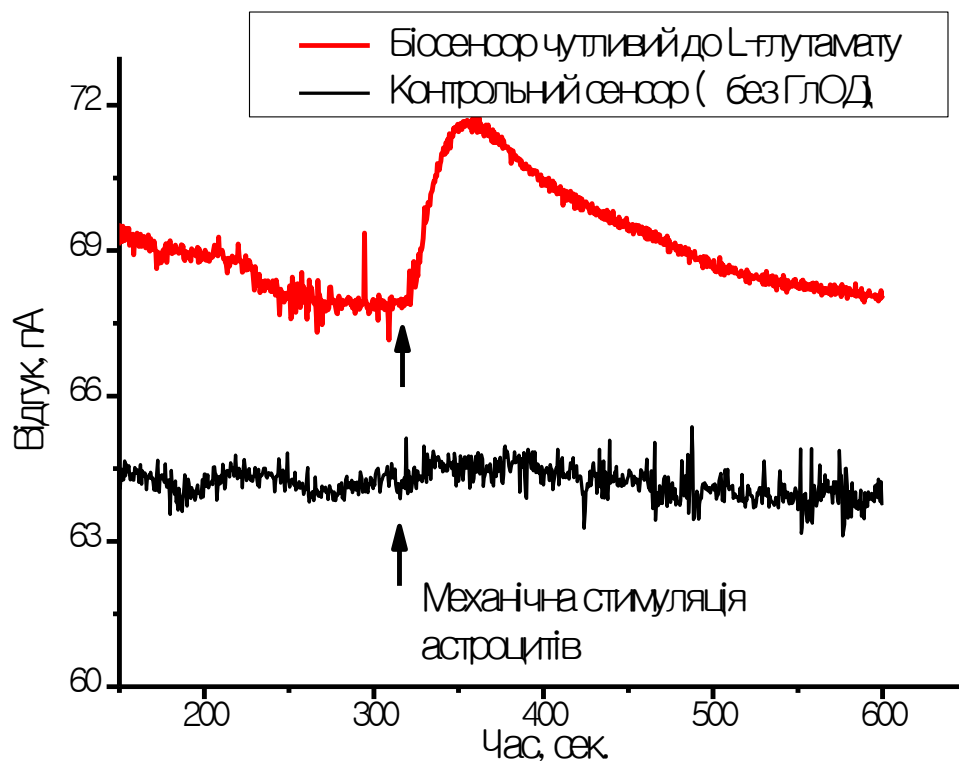


Рис. 5.6. Експериментальні дані щодо біосенсорного моніторингу секреції L-глутамату *in vitro* у культурі клітин астроцитів.

Як видно з рис. 5.6, механічна стимуляція активності клітин астроцитів, яку проводили після стабілізації відгуку обох сенсорів, призводила до швидкого збільшення сигналу, який реєструвався за допомогою біосенсора чутливого до L-глутамату. В той же час, сигнал зареєстрований за допомогою контрольного сенсора (не чутливого до L-глутамату), після стимуляції астроцитів, залишався практично на тому ж рівні. Оскільки селективність до

дії інтерферуючих речовин (аскорбінова кислота, допамін, тощо, секрецію яких також могло спровокувати механічне стимулювання) є ідентичною для обох сенсорів, можна стверджувати, що отриманий сигнал є специфічним і відповідає локальному збільшенню концентрації глутамату за рахунок його секреції клітинами культури астроцитів.

Таким чином, було успішно продемонстровано селективний моніторинг *in vitro* рівню L-глутамату за допомогою двохферментного мікробіосенсора на прикладі культури астроцитів.

5.7. Аналіз концентрації АТФ, глюкози та активності креатинінкінази у зразках сироватки крові за допомогою мультиферментної бісенсорної системи

Відомо, що одночасне визначення АТФ, глюкози і КК стає в нагоді при діагностиці та контролі лікування серцево-судинних захворювань (в першу чергу інфаркту міокарда), шоківих станів та малярії. Апробацію розробленої біосенсорної системи було вирішено провести шляхом визначення зазначених речовин в зразках сироватки крові пацієнтів з артеріальною гіпертензією (зразки 1-6), серцевою недостатністю (зразки 7-9) та інфарктом міокарду (зразки 10 і 11). Для моделювання різних станів пацієнта і перевірки роботи біосенсорної системи в широкому діапазоні концентрацій, до зразків було додано різні кількості АТФ та КК. Біосенсорні вимірювання проводились за процедурою, апробованою при роботі з модельними зразками: отримували базову лінію, додавали аліквоту сироватки крові, отримували відгуки обох біосенсорів у складі системи, додавали субстрати КК і реєстрували швидкість зменшення відгуку біосенсора на основі ГОД/ГЕК. Концентрації АТФ і глюкози та активність КК визначали за попередньо побудованими калібрувальними кривими.

В якості контрольного методу визначення використовувався метод спектрофотометрії, адаптований з роботи [189]. Він базувався на визначенні пероксиду водню, який продукувався внаслідок ферментативної реакції окиснення глюкози глюкозооксидазою (див. Матеріали і методи). Отримані результати наведені в таблиці 5.7.

Таблиця 5.7

Концентрації глюкози, АТФ та активність КК в зразках крові, визначені за допомогою біосенсорної системи та контрольного методу аналізу (n=3)

Но- мер зраз- ку	Концентрація глюкози		Концентрація АТФ		Активність КК	
	Вимірю- вання біосенсор- ною системою	Вимірю- вання спектро- фотомет- рією	Вимірю- вання біосенсор- ною системою	Вимірю- вання спектро- фотомет- рією	Вимірю- вання біосенсор- ною системою	Вимірю- вання спектро- фотомет- рією
1	3,3 ± 0,2	3,0 ± 0,2	0,37 ± 0,07	0,40 ± 0,10	1,03 ± 0,31	0,79 ± 0,24
2	2,9 ± 0,4	3,3 ± 0,3	0,45 ± 0,09	0,41 ± 0,08	1,60 ± 0,48	1,40 ± 0,42
3	6,5 ± 0,3	7,0 ± 0,2	0,58 ± 0,14	0,63 ± 0,12	0,73 ± 0,22	0,63 ± 0,19
4	5,8 ± 0,2	5,5 ± 0,2	0,49 ± 0,12	0,54 ± 0,11	0,87 ± 0,26	0,64 ± 0,19
5	4,9 ± 0,2	4,4 ± 0,2	0,61 ± 0,13	0,69 ± 0,16	1,97 ± 0,41	2,30 ± 0,54
6	4,5 ± 0,2	4,6 ± 0,2	0,62 ± 0,13	0,60 ± 0,12	1,71 ± 0,51	1,40 ± 0,42
7	2,4 ± 0,2	2,5 ± 0,3	0,54 ± 0,11	0,52 ± 0,11	0,26 ± 0,08	0,33 ± 0,10
8	11,2 ± 0,1	11,8 ± 0,2	0,32 ± 0,05	0,30 ± 0,05	0,76 ± 0,23	0,90 ± 0,27
9	2,4 ± 0,3	2,6 ± 0,3	0,33 ± 0,08	0,31 ± 0,04	1,21 ± 0,36	1,10 ± 0,33
10	5,8 ± 0,3	5,4 ± 0,2	0,46 ± 0,10	0,47 ± 0,09	0,67 ± 0,20	0,50 ± 0,15
11	4,1 ± 0,1	3,5 ± 0,3	0,42 ± 0,11	0,39 ± 0,08	0,35 ± 0,11	0,27 ± 0,08

Розглянемо більш детально результати вимірювань кожної речовини окремо. Точність визначення концентрації глюкози біосенсорною системою була найвищою, оскільки для цього використовується прямий ферментний аналіз на основі одного ферменту. Кореляція між результатами визначення глюкози біосенсорною системою і контрольним методом аналізу (R^2) була 0,975 (рис. 5.7 та 5.8).

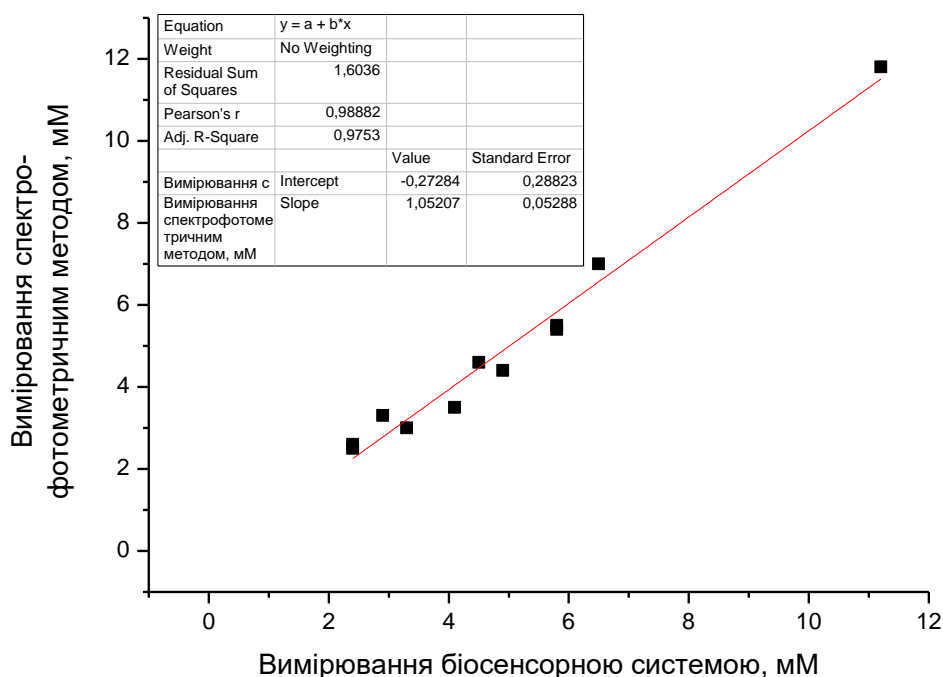


Рис. 5.7. Кореляція даних, отриманих за допомогою біосенсорної системи та контрольного методу визначення глюкози.

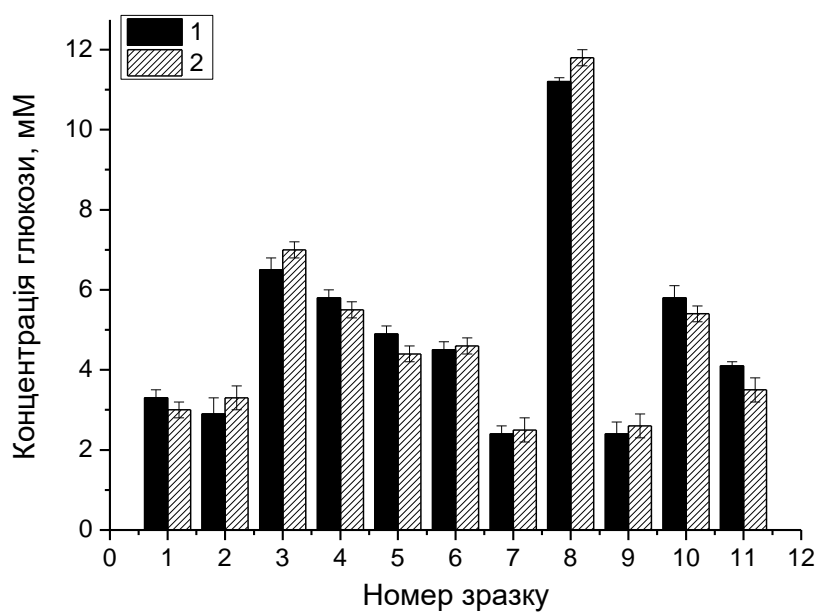


Рис. 5.8. Порівняння даних визначення глюкози в зразках сироватки крові, отриманих за допомогою біосенсорного методу (1) та контроль (2).

Точність визначення АТФ біосенсорною системою була дещо гіршою, через те, що процедура визначення АТФ є більш складною і включає в себе

дві конкуруючі ферментативні реакції. Однак, слід відмітити, що кореляція між результатами визначення концентрацій АТФ біосенсорною системою і контрольним методом аналізу (R^2) була задовільною – 0,912 (рис. 5.9 та 5.10).

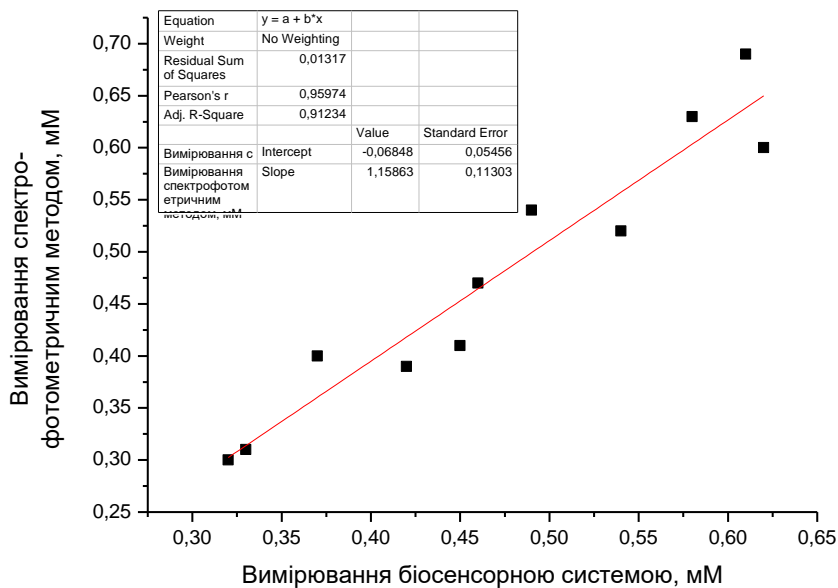


Рис. 5.9. Кореляція даних, отриманих біосенсорною системою та контрольним методом визначення АТФ.

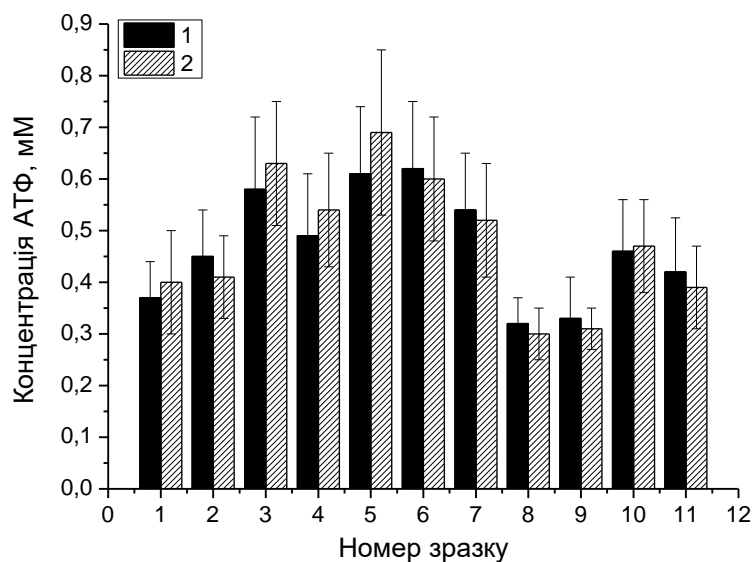


Рис. 5.10. Порівняння даних визначення АТФ в зразках сироватки крові, отриманих біосенсорним методом (1) та контрольним (2).

Процедура визначення активності КК біосенсорною системою проводилась подібно до визначення концентрації АТФ, але включала ще одну ферментативну реакцію, що погіршувало точність вимірювання. Кореляція між результатами визначення активності КК біосенсорною системою і контрольним методом аналізу (R^2) складала 0,886 (рис. 5.11 та 5.12).

Слід відмітити, що отримані значення концентрацій глюкози і АТФ, а також активності КК співпадають з літературними даними. Таким чином, концентрація глюкози у хворих та здорових людей знаходились в межах 2-15 мМ [310–312], АТФ – 0,25-0,70 мМ [313], а активність КК – від 0,026 до 2 од. акт./мл [89, 167, 279].

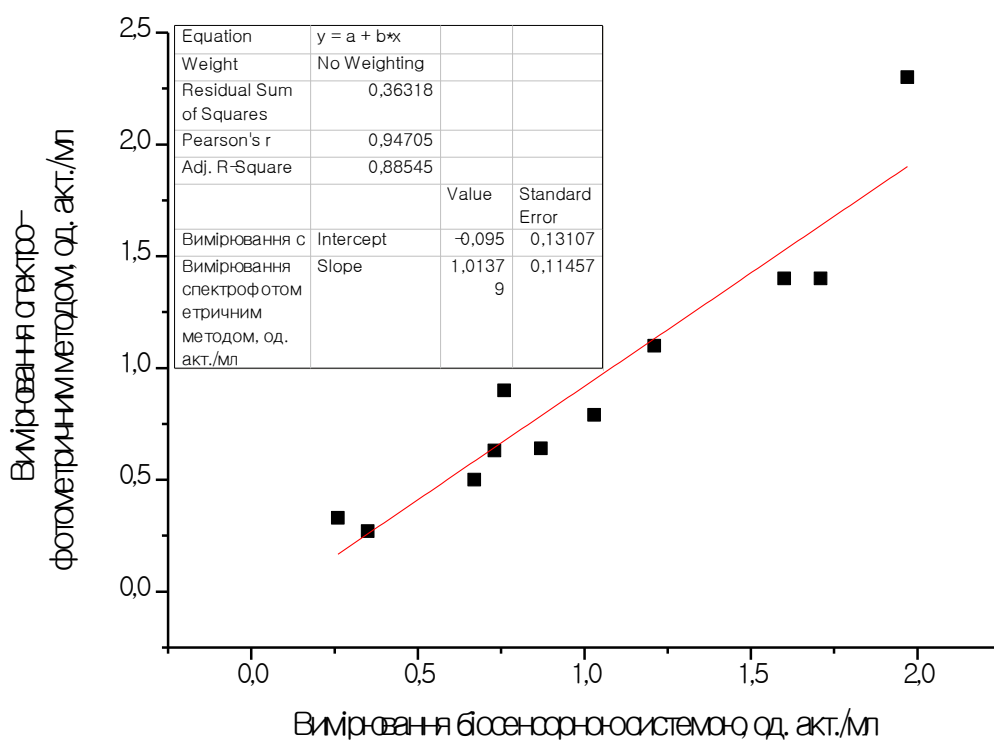


Рис. 5.11. Кореляція даних, отриманих за допомогою біосенсорного та контрольного методу визначення КК.

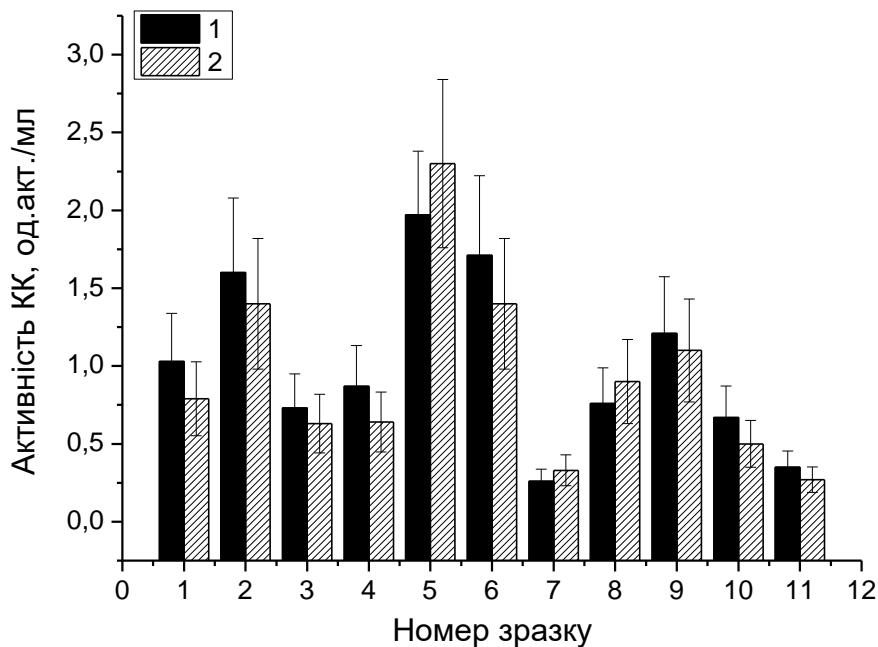


Рис. 5.12. Порівняння даних визначення активності КК в зразках сироватки крові, отриманих за допомогою біосенсорної системи (1) та контрольного методу аналізу (2).

Отже, успішне використання розробленої в даній роботі біосенсорної системи для аналізу концентрацій глюкози і АТФ, а також активності КК в реальних зразках сироватки крові свідчить про ефективність цієї розробки і можливість її практичного використання для контролю експрес-діагностики інфаркту міокарду та інших захворювань м'язів.

5.8. Висновки до розділу 5

Таким чином, функціонування розроблених лабораторних прототипів мультиферментних біосенсорів на основі різних електрохімічних перетворювачів було проаналізовано з точки зору їх практичного застосування та апробовано при роботі з реальними зразками.

Дані отримані усіма запропонованими біосенсорами було порівняно із результатами аналізу загальноприйнятими традиційними методиками та показана висока кореляція отриманих результатів.

Результати цього розділу опубліковано в працях:

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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. **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.
6. 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.
7. 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.

8. **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.

9. 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.

10. 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.

РОЗДІЛ 6

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

6.1. Вступ

В результаті проведеного дисертаційного дослідження сформульовано ряд корисних порад стосовно проектування, розроблення, виготовлення та подальшого застосування різних варіантів мультиферментних електрохімічних біосенсорів. Запропоновано методика попередньої оцінки перспективності розробки відповідного біосенсора на основі декількох ферментів з урахуванням можливості його практичного застосування. Крім того, запропоновано детальну покрокову процедуру розробки мультиферментних біосенсорів. Також, за результатами розробки низки мультиферментних біосенсорів, було сформульовано основні переваги та обмеження, що слід очікувати та брати до уваги при створенні нових мультиферментних біосенсорів.

6.2. Аналіз доцільності розробки біосенсора на основі декількох ферментів

Для того, щоб не витратити марно ресурси на розробку та створення неефективних і неперспективних біосенсорних приладів, перед розробкою кожного нового біосенсора на основі мультиферментних систем, необхідно проаналізувати декілька важливих питань стосовно перспективності запланованої розробки. Відповідно, в нашій роботі було запропоновано

методику аналізу доцільності розробки нового біосенсора на основі декількох ферментів (рис. 6.1).



Рис. 6.1. Блок-схема аналізу доцільності розробки нового біосенсора на основі декількох ферментів.

Спочатку необхідно визначити, чи є вже розроблені біосенсори на основі одного ферменту для визначення тієї ж речовини, що планується визначати новим біосенсором. Якщо так, то слід встановити, які переваги матиме використання саме мультиферментної системи перед більш простим і ймовірно дешевшим одноферментним біосенсором.

Далі необхідно встановити, чи можуть усі ферменти, що плануються у складі мультиферментної системи, функціонувати одночасно в однакових умовах (рН, присутність кофакторів, тощо). Наступне питання: чи всі ферменти мають достатньо високу активність для швидкого перебігу усіх реакцій? Інше дуже важливе питання для поєднання ферментів в одну систему - стабільність при зберіганні кожного з ферментів у складі біосенсорної системи. Якщо, хоч один фермент має погану стабільність, то і біосенсор буде мати малий термін придатності. Звісно, при іммобілізації властивості ферментів дещо змінюються, але якщо в природі запропоновані ферменти працюють в дуже різних умовах та мають дуже різні активності та стабільність, то поєднувати їх в одну систему навряд чи доцільно.

Майже всі біологічні рідини є багатоконпонентними, тому для розробки мультиферментного біосенсора необхідно з'ясувати, чи можуть бути присутніми у реальних зразках, що будуть аналізуватись біосенсором, речовини, які є субстратами ферментів у складі біосенсора (крім цільової речовини). Якщо так, то чи можливо буде визначити концентрацію цільової речовини на фоні інших субстратів?

В деяких випадках можна обійти необхідність використання додаткових ферментів іншими методами. Наприклад, ПХ часто використовують для передачі електронів від пероксиду водню до медіатора, який вже передає їх до робочого електроду при зниженому потенціалі. Теоретично це дозволяє запобігти окисненню інтерферуючих речовин на електроді при високому робочому потенціалі, проте, часто дані речовини (зокрема, аскорбінова кислота) гарно окиснюються медіатором і все одно призводять до помилкового сигналу біосенсора. Тому можна відмовитись від ПХ та медіатора і використати іншу методику для запобігання впливу інтерферентів – нанесення на електрод напівпроникних мембран, зокрема на основі фенілендіаміну, які ефективно запобігають проникненню до поверхні

електроду електроактивних речовин, але пропускають невеликі молекули типу пероксиду водню [300, 314].

Відповідно, якщо усі питання, описані вище, з'ясовані та враховані, можна переходити до наступного кроку, а саме - розробки мультиферментного біосенсора.

6.3. Методика створення біосенсорів на основі декількох ферментів

В ході виконання даної дисертаційної роботи було створено цілу низку лабораторних прототипів мультиферментних біосенсорів. Спираючись на досвід та враховуючи труднощі, що виникали в процесі цих розробок, було запропоновано покрокову методику розробки мультиферментних електрохімічних біосенсорів. Схема цієї методики приведена на рис. 6.2.

Першим етапом роботи з виготовлення мультиферментних електрохімічних біосенсорів - є підготовка перетворювачів. Спочатку очищені перетворювачі тестувались на придатність до використання у розробці біосенсорів. Тестування проводили з використанням запропонованих та описаних вище методик (див. розділ 3). За результатами тестування, при необхідності, перетворювачі модифікували додатковими мембранами з метою покращення їхніх робочих параметрів. Далі досліджувались аналітичні характеристики перетворювачів. За результатами перевірки обирались найкращі перетворювачі зі схожими характеристиками.

Паралельним етапом виготовлення мультиферментних біосенсорів є вибір оптимальної схеми електрохімічного аналізу (див. розділ 3). Перш за все, визначають, який електрохімічний метод буде використовуватись в роботі. Його обирають в залежності від продукту, що буде утворюватись в ході ферментативних реакцій. Наприклад, якщо в ході реакцій змінюється провідність, доцільно використовувати кондуктометричний метод, а якщо

змінюється рН - використовують потенціометрію. Визначившись з методом, необхідно вибрати відповідний біосенсорний прилад та схему виміральної установки.



Рис. 6.2. Схематичне зображення методики розробки мультиферментних біосенсорів.

Далі, можна переходити до етапу створення біоселективних елементів на основі декількох ферментів. Згідно даних, описаних в літературі, та враховуючи особливості усіх ферментів (що будуть включені у єдину систему) обирають декілька найбільш придатних методів іммобілізації. Обрані методи іммобілізації порівнюють за такими параметрами як, чутливість біосенсора до субстрату, межа вимірювання, лінійний діапазон, шум та дрейф базової лінії, стабільність протягом робочого дня. Також підбирають оптимальний склад мультиферментної мембрани: співвідношення ферментів, концентрацію зшиваючого агенту та інших компонентів біоселективного елементу, та визначають оптимальні умови проведення цієї іммобілізації. Отримані після іммобілізації біосенсори тестують за різних умов функціонування (зміна рН, іонної сили та буферної ємності розчину) з метою вибору оптимального робочого буферного розчину та підготовки для подальшого використання розробленого мультиферментного біосенсора при аналізі реальних зразків. Крім того, за необхідності, проводять вибір оптимальних концентрацій кофакторів та ко-субстратів.

Наступним етапом на шляху створення біосенсорів є перевірка їхньої стабільності, а саме - відтворюваності відгуків мультиферментних біосенсорів при безперервній роботі протягом дня, операційної стабільності протягом декількох тижнів та стабільності при довготривалому зберіганні. Часто необхідно перевіряти зберігання біосенсорів за різних умов. Наприклад, в сухому стані за кімнатної температури, $+4^{\circ}\text{C}$, -4°C та -18°C , а також в буферному розчині за кімнатної температури та $+4^{\circ}\text{C}$. Ще одним параметром, з яким можуть виникати проблеми при розробці мультиферментних систем, і який необхідно досліджувати, є відтворюваність приготування біосенсорів.

Далі проводять визначення аналітичних характеристик лабораторних прототипів мультиферментних біосенсорів. Досліджують мінімальну межу

визначення, яка вимірюється як концентрація аналіту доданого в розчин, що призводить до відгуку біосенсора в три рази більшого за величину шуму базової лінії. За калібрувальною кривою визначається лінійний діапазон та чутливість до субстрату. Також необхідно отримати рівняння калібрувальної кривої, за допомогою якої, в подальшому аналізуватимуться реальні зразки.

Успішний аналіз концентрації речовин у реальних зразках є безумовним підтвердженням працездатності біосенсорів та можливості їх практичного використання. Тому, на останньому етапі роботи, створені згідно запропонованих в роботі методик лабораторні прототипи біосенсорів на основі декількох ферментів, необхідно перевірити шляхом аналізу реальних зразків. Отримані результати обов'язково порівнюють з даними традиційних методів аналізу. За умови високої кореляції результатів, розробку біосенсора можна вважати завершеною. В результаті буде отримано діючий лабораторний прототип мультиферментного біосенсора, що може бути основою для створення промислового зразку відповідного біосенсора.

Зважаючи на практичну спрямованість запропонованих мультиферментних біосенсорів було розраховано приблизну вартість біосенсорного аналізу, самого мультиферментного біосенсора і всієї установки для вимірювань за умов їх масового виробництва. Звісно ціна на самі біосенсори буде варіювати в залежності від методу аналізу та використаних ферментів. Було вираховано, що приблизна коштовність амперметричного мультиферментного біосенсора – 100-150 грн, а для кондуктометричного мультиферментного біосенсора – 40-70 грн.

Для амперметричних вимірювань використовується потенціостат PalmSens (100000 грн.), але як було показано в роботі потенціостат виготовлений колегами з Інституту електродинаміки НАН України мав не гірші характеристики, а коштував – 15000 грн. Кондуктометр українського виробництва також коштував – 15000 грн. Звісно вартість біосенсорних

приладів, на декілька порядків нижча за ціни приладів, що використовуються в традиційних методах визначення.

Стосовно собівартості аналізу з використанням мультиферментних біосенсорів, це приблизно 10-20 грн. за аналіз одного аналіту, що в 5-10 разів менше ніж зараз в комерційних лабораторіях.

6.4. Переваги використання мультиферментних систем в складі біосенсорів

Створення електрохімічних біосенсорів на основі кількох ферментів має ряд переваг:

1) Розширення кола сполук, що можна детектувати біосенсором. Кількість ферментів, що можна використовувати при створенні біосенсорів є лімітованим, оскільки не всі ферменти в ході ферментативних реакцій продукують речовини, що можуть реєструватись електрохімічними перетворювачами. Відповідно, кількість речовин, які можливо визначати за допомогою ферментних біосенсорів також обмежується. Тому, створюються мультиферментні системи, які, наприклад, можуть поступово розщеплювати складну речовину до продукту, який можна реєструвати за допомогою електрохімічних перетворювачів.

2) Покращення чутливості біосенсорів. Чутливість до субстрату є однією з найбільш важливих характеристик майже будь-якого біосенсора. Це не дивно, оскільки концентрація багатьох важливих аналітів в реальних зразках дуже низька (менше 1 мкМ), а нижня межа визначення звичайних моноферментних біосенсорів становить зазвичай більше 1 мкМ. Одним з варіантів аналізу більш низьких концентрацій речовин є багаторазове використання субстрату, яке досягається в мультиферментних біосенсорах на основі циклічних

ферментативних реакцій, в процесі протікання яких субстрат регенерується та повторно використовується.

3) *Уникнення ефекту інгібування ферментів продуктами.* Часто ефект інгібування фермента продуктом може сильно впливати на точність та чутливість біосенсорного аналізу. Відповідно використання каскаду ферментативних реакцій, в якому продукт одного ферменту одразу ж використовується іншим ферментом, забезпечує безперервне протікання реакцій.

4) *Зменшення чутливості біосенсорів до впливу інтерферентів.* Одним із підходів щодо покращення селективності біосенсора - є використання у складі біоселективного елементу біосенсора додаткового ферменту, який розщеплює інтерференти. Відповідно, в мембрані мультиферментного біосенсора відбувається зменшення концентрації небажаної речовини, яка негативно впливає на роботу біосенсора. Такий підхід дозволяє мультиферментному біосенсору працювати в складних багатокомпонентних сумішах, що часто є не можливим для моноферментних біосенсорних приладів.

5) *Збільшення кількості біосенсорних субстратів.* Інколи є необхідним розробити прилад для одночасного визначення декількох субстратів, або інгібіторів без їх диференціації між собою. Одним з варіантів є розробка мультибіосенсорів на основі низки біосенсорних елементів. Більш конструктивно простим варіантом є створення біосенсора на основі декількох ферментів. Відповідно, цей біосенсор зможе сигналізувати про наявність в аналізованому зразку хоча б одного з субстратів. Нажаль, за сигналом біосенсора не можливо визначити який конкретно субстрат, чи декілька субстратів присутні в досліджуваному зразку.

6.5. Обмеження при створенні мультиферментних біосенсорів

Створення біосенсорів на основі декількох ферментів може бути обмеженим наступними факторами:

1) *Чутливість біосенсора до декількох речовин одночасно.* Біосенсор на основі декількох ферментів є чутливим одночасно до субстратів всіх своїх ферментів. Зазвичай це є вкрай небажаним, оскільки неможливо визначити концентрації різних субстратів у їхніх сумішах одним біосенсором. Тому при розробці біосенсорів вибираються такі ферментні системи, субстрати яких практично відсутні у тих зразках, для яких пропонується використати біосенсор (звісно, крім одного субстрату, для визначення якого і розробляється біосенсор). Іншим можливим виходом із ситуації - є створення систем і масивів з декількох біосенсорів, в яких один із біосенсорів є чутливим лише до однієї речовини, а інший – до декількох. За рахунок аналізу даних отриманих від декількох біосенсорів, можливо визначити концентрації всіх речовин у зразку.

2) *Необхідність іммобілізації ферментів в однакових умовах.* Ферменти мають різні оптимальні умови іммобілізації, і при розробці біосенсорів необхідно підібрати такі умови, які можливо будуть не оптимальними повністю, але компромісними і будуть підходити для всіх використаних ферментів. Проте, така «компромісна» іммобілізація може призводити до гіршої активності ферментів, аніж при окремій іммобілізації ферментів в оптимальних умовах. Хоча існують підходи для пошарової іммобілізації декількох ферментів - в більшості робіт використовують значно простішу ко-іммобілізацію ферментів в єдиному матриксі або на одному носії.

3) *Необхідність функціонування ферментів в однакових умовах (рН, тип буферу, присутність кофакторів).* Як і у попередньому випадку, робота

ферментів в компромісних умовах може бути гіршою, аніж роздільна робота ферментів у оптимальних для кожного з них умовах.

4) *Збільшення часу, необхідного на розробку біосенсора.* Це викликано необхідністю проведення додаткових експериментів, зазначених у попередніх пунктах. Крім того, необхідно експериментально підбирати співвідношення ферментів для найбільш ефективного їхнього функціонування.

5) *Обмеження стабільності функціонування біосенсора, зумовлене низькою стабільністю одного з ферментів.* Наприклад, у випадку АТФ-чутливих біосенсорів на основі системи глюкозооксидаза/гексокіназа, глюкозооксидаза зберігає активність багато місяців (інколи і до року), а гексокіназа втрачає її вже через 1-2 місяці. Відповідно і тривалість зберігання біосенсора буде до 2 місяців.

б) *Збільшення часу відгуку біосенсора.* У випадку протікання декількох послідовних ферментативних реакцій в біоселективній мембрані, інколи, зростає тривалість відгуку біосенсора. Це пояснюється тим, що на відміну від одноферментної реакції, каскади ферментних реакцій мають лаг-фазу перед досягненням лінійної фази, в якій швидкість каталізу стає постійною. Тривалість лаг-фази залежить від умов проведення реакції і активності ферментів.

7) *Збільшення складності і відповідно вартості виготовлення біосенсора.*

Існує безліч можливих комбінацій ферментів, які можуть бути використані для створення біосенсорів. Втім, при розробці біосенсорів на основі нових мультиферментних систем, потрібно пам'ятати, що біосенсори – це в першу чергу прилади для практичного використання, і тому не слід створювати біосенсори, які з самого початку будуть мати надмірно високу вартість і складність виготовлення, або занижкий час зберігання. Такі біосенсори не матимуть практичної цінності.

6.6. Метрологічні дослідження

Для метрологічного забезпечення розроблених мультиферментних біосенсорів необхідно виконати комплекс заходів, які умовно можна розділити на чотири етапи, які відповідають структурним елементам вимірювальних систем. Це розробка метрологічного забезпечення для первинного вимірювального перетворювача, вторинного вимірювального перетворювача, вимірювача фізичної величини (провідність, струм, рН, тощо) та безпосередньо біосенсорної системи. Результати цих досліджень повинні бути виражені в узаконених одиницях фізичних величин і представлені в стандартній формі.

Перш за все необхідно мати еталони фізичних величин відповідного рівня. Взаємодія між ними регламентується перевірними схемами, що наведені у відповідних державних стандартах. Враховуючи специфіку біосенсорних вимірювань, в якості цих еталонів можуть виступати або стандартні зразки (розчини) або взірцеві (еталонні) прилади. Першим кроком метрологічного забезпечення сенсорних систем є вивчення стану еталонної бази, наявність існуючих та необхідність створення нових еталонів і перевірних схем для кожної із вхідних фізичних величин, що підлягають вимірюванню. Необхідно провести основні типи робіт: розробити документацію, провести експертизу та затвердити її в органах Держстандарту, придбати відповідне обладнання, розробити, виготовити та дослідити допоміжні засоби для проведення досліджень, провести самі метрологічні дослідження. Якщо допоміжними засобами для проведення досліджень є стандартні зразки, перелік робіт додатково включає: пошук та вивчення найкращого арбітражного методу вимірювання концентрації, визначення діапазону варіації та кількості точок для контролю метрологічних характеристик, дослідження зразків (відповідний мультиферментний

біосенсор) у часі (відповідний мультиферментний біосенсор), встановлення інтервалу збереження цих зразків, встановлення умов експлуатації та збереження зразків.

6.6.1. Відпрацювання двох методик приготування калібрувальних розчинів аналітів, концентрація яких визначається мультиферментними біосенсорами

В рамках виконання дисертаційної роботи відпрацьовано та стандартизовано низку процедур приготування калібрувальних розчинів субстратів, що будуть визначатись мультиферментними біосенсорами, враховуючи вимоги техніки безпеки та вимоги до кваліфікації операторів, охарактеризовано засоби вимірювальної техніки, допоміжні пристрої, реактиви і матеріали, які мають бути для цього використані, та умови готування; проведено розрахунки підсумкової концентрації розчинів та оцінку рівнів стандартної та розширеної невизначеності значень цих концентрацій або розширеної невизначеності величини їх активностей (Додаток Д).

В державному підприємстві «Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів (ДП «Укрметртестстандарт») затверджено методику готування розчинів ацетилхолін хлориду та бутирилхолінхлориду у буферному розчині з рН 7,4 та розрахунку розширеної невизначеності їх концентрацій за № 920-36-10, методику готування розчинів цукрози, глюкози, лактози та мальтози у буферному розчині з рН 7,4 та розрахунку розширеної невизначеності їх концентрацій за № 919-36-10, методику приготування розчину агрініну та розрахунку розширеної невизначеності їх концентрацій за № 081/36-0857-13, методику готування розчину АТФ та розрахунку розширеної невизначеності

їх концентрацій за № 36/1049-17, методику готування розчинів реактиваторів ЕДТА та цистеїну у буферному розчині з рН 7,4 та розрахунку розширеної невизначеності їх концентрацій за № 36/1048-17 та методику готування розчину креатинкінази з відповідною активністю та способу оцінювання розширеної невизначеності величини її активності за № 36/900-18, право власності на які належить Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

6.6.2. Відпрацювання методик градуювання різних варіантів лабораторних прототипів біосенсорів на основі мультиферментних систем

Відпрацьовано та стандартизовано процедури аналізу концентрацій сахарози, мальтози, лактози та АТФ з використанням мультиферментних біосенсорів, враховуючи вимоги техніки безпеки та вимоги до кваліфікації операторів, охарактеризовано засоби вимірювальної техніки, допоміжні пристрої, реактиви і матеріали, які мають бути для цього використані, та умови готування; проведено розрахунки підсумкової концентрації вказаних речовин та оцінку рівнів стандартної та розширеної невизначеності значень цих концентрацій (Додаток Е).

В державному підприємстві «Всеукраїнський державний науково-виробничий центр стандартизації, метрології, сертифікації та захисту прав споживачів (ДП «Укрметртестстандарт») затверджено методику градуювання лабораторного прототипу приладу для вимірювання концентрацій мальтози у водних розчинах за № 081/36-0863-13, методику градуювання лабораторного прототипу мультиферментного біосенсора для визначення молярної концентрації сахарози в напоях за № 1045-36-12, методику градуювання лабораторного прототипу приладу для визначення концентрації лактози в

молочних продуктах за № 1048-36-12 та методику градування лабораторного прототипу мультиферментного біосенсора, призначеного для вимірювання концентрації АТФ за № 36/902-18 право власності на які належить Інституту молекулярної біології і генетики НАН України.

6.7. Висновки до розділу 6

В даному розділі було проаналізовано результати створення різних мультиферментних електрохімічних біосенсорів. Запропоновано методику попереднього аналізу доцільності розробки біосенсора на основі декількох ферментів. За умови доведення перспективності конкретного біосенсора, застосовується покрокова методика розробки мультиферментних електрохімічних біосенсорів різного призначення. Крім того, в роботі наведено основні переваги та недоліки використання мультиферментних систем в складі біосенсорів. Проведено метрологічні дослідження, за результатами яких низку розроблених методик затверджено в ДП «Укрметртестстандарт».

Практичне використання запропонованих методик буде корисним при розробці нових мультиферментних біосенсорів, оскільки значно зменшить витрати часу та коштів дослідників на проведення таких досліджень.

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 біосенсори 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 ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Couto R., Lima J. , Quinaz M. Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. *Talanta*. 2016. Vol. 146. P. 801–814.
2. Tudorache M., Bala C. Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007. Vol. 388. № 3. P. 565–578.
3. Das P., Das M., Chinnadayala S. R., Singha I. M., Goswami P. Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics*. 2016. Vol. 79. P. 386–397.
4. Choi M. Progress in enzyme-based biosensors using optical transducers. *Microchimica Acta*. 2004. Vol. 148. № 3–4. P. 107–132.
5. Ronkainen N. J., Halsall H. B., Heineman W. R. Electrochemical biosensors. *Chemical Society Reviews*. 2010. Vol. 39. № 5. P. 1747.
6. Sin M. L., Mach K. E., Wong P. K., Liao J. C. Advances and challenges in biosensor-based diagnosis of infectious diseases. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2014. Vol. 14. № 2. P. 225–244.
7. Velasco-Garcia M., Mottram T. Biosensor Technology addressing Agricultural Problems. *Biosystems Engineering*. 2003. Vol. 84. № 1. P. 1–12.
8. Windmiller J., Wang J. Wearable electrochemical sensors and biosensors: a review. *electroanalysis*. 2013. Vol. 25. № 1. P. 29–46.
9. Rotariu L., Lagarde F., Jaffrezic-Renault N., Bala C. Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2016. Vol. 79. P. 80–87.
10. Grieshaber D., MacKenzie R., Vörös J., Reimhult E. Electrochemical

biosensors -sensor principles and architectures. *Sensors*. 2008. Vol. 8. № 3. P. 1400–1458.

11. Hayat A., Catanante G., Marty J. Current trends in nanomaterial-based amperometric biosensors. *Sensors*. 2014. Vol. 14. № 12. P. 23439–23461.

12. Bratov A., Abramova N., Ipatov A. Recent trends in potentiometric sensor arrays—A review. *Analytica Chimica Acta*. 2010. Vol. 678. № 2. P. 149–159.

13. Jaffrezic-Renault N., Dzyadevych S. Conductometric Microbiosensors for Environmental Monitoring. *Sensors*. 2008. Vol. 8. № 4. P. 2569–2588.

14. Randviir E. P., Banks C. E. Electrochemical impedance spectroscopy: an overview of bioanalytical applications. *Analytical Methods*. 2013. Vol. 5. № 5. P. 1098.

15. Guo X. Surface plasmon resonance based biosensor technique: A review. *Journal of Biophotonics*. 2012. Vol. 5. № 7. P. 483–501.

16. Uhr M. L. Coupled enzyme systems: Exploring coupled assays with students. *Biochemical Education*. 1990. Vol. 18. № 1. P. 48–50.

17. Wilkinson J. H. Enzyme kinetics and its relevance to enzyme assay. *Journal of clinical pathology. Supplement (Association of Clinical Pathologists)*. 1970. Vol. 4. P. 14–21.

18. Bai L., Yuan R., Chai Y., Yuan Y., Zhuo Y., Mao L. Bi-enzyme functionalized hollow PtCo nanochains as labels for an electrochemical aptasensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011. Vol. 26. № 11. P. 4331–4336.

19. Xiang Y., Zhang Y., Jiang B., Chai Y., Yuan R. Multi-enzyme layer-by-layer assembly for dual amplified ultrasensitive electronic detection of cancer biomarkers. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2011. Vol. 155. № 1. P. 317–322.

20. Betancor L., Luckarift H. Co-immobilized coupled enzyme systems in biotechnology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 2010. Vol. 27. № 1. P. 95–114.

21. Araújo W. L., Nunes-Nesi A., Nikoloski Z., Sweetlove L. J., Fernie A. R.

- Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. *Plant, Cell & Environment*. 2012. Vol. 35. № 1. P. 1–21.
22. Nelson D. L., Cox M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company. 2008.
23. Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. *Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company. 2012.
24. Han Y. D., Jang Y. H., Yoon H. C. Cascadic Multienzyme Reaction-Based Electrochemical Biosensors. 2013. P. 221–251.
25. Bisswanger H. Enzyme assays. *Perspectives in Science*. 2014. Vol. 1. № 1–6. P. 41–55.
26. Khadro B., Namour P., Bessueille F., Leonard D., Jaffrezic-Renault N. Validation of a conductometric bienzyme biosensor for the detection of proteins as marker of organic matter in river samples. *Journal of Environmental Sciences*. 2009. Vol. 21. № 4. P. 545–551.
27. Soldatkin O. O., Peshkova V. M., Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P., Jaffrezic-Renault N., El'skaya A. V. Novel sucrose three-enzyme conductometric biosensor. *Materials Science and Engineering: C*. 2008. Vol. 28. № 5–6. P. 959–964.
28. Soldatkin O. O., Peshkova V. M., Saiapina O. Y., Kucherenko I. S., Dudchenko O. Y., Melnyk 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.
29. Gamella M., Campuzano S., Conzuelo F., Curiel J. A., Muñoz R., Reviejo A. J., Pingarrón J. M. Integrated multienzyme electrochemical biosensors for monitoring malolactic fermentation in wines. *Talanta*. 2010. Vol. 81. № 3. P. 925–933.
30. Gamella M., Campuzano S., Reviejo A. J., Pingarrón J. M. Integrated

multienzyme electrochemical biosensors for the determination of glycerol in wines. *Analytica Chimica Acta*. 2008. Vol. 609. № 2. P. 201–209.

31. Crumbliss A. L., Stonehuerner J. G., Henkens R. W., Zhao J., O'Daly J. A carrageenan hydrogel stabilized colloidal gold multi-enzyme biosensor electrode utilizing immobilized horseradish peroxidase and cholesterol oxidase/cholesterol esterase to detect cholesterol in serum and whole blood. *Biosensors & bioelectronics*. 1993. Vol. 8. № 6. P. 331–7.

32. Gajovic N., Warsinke A., Scheller F. W. A novel multienzyme electrode for the determination of citrate. *Journal of Chemical Technology AND Biotechnology*. 1995. Vol. 63. № 4. P. 337–344.

33. Radu G. L., Coulet P. R. Amperometric Peptide Sensor for Protein Determination. *Analytical Letters*. 1993. Vol. 26. № 7. P. 1321–1332.

34. Mousty C., Cosnier S., Shan D., Mu S. Trienzymatic biosensor for the determination of inorganic phosphate. *Analytica Chimica Acta*. 2001. Vol. 443. № 1. P. 1–8.

35. Koncki R., Wałecz I., Ruckruh F., Głab S. Bienzymatic potentiometric electrodes for creatine and l-arginine determination. *Analytica Chimica Acta*. 1996. Vol. 333. № 3. P. 215–222.

36. Dudchenko O. Y., Pyeshkova V. M., Soldatkin O. O., Akata B., Kasap B. O., Soldatkin A. P., Dzyadevych S. V. Development of Silicalite/Glucose Oxidase-Based Biosensor and Its Application for Glucose Determination in Juices and Nectars. *Nanoscale research letters*. 2016. Vol. 11. № 1. P. 59.

37. Dzyadevich S. V, Korpan Y. I., Arkhipova V. N., Alesina MYu, Martelet C., El'Skaya A. V, Soldatkin A. P. Application of enzyme field-effect transistors for determination of glucose concentrations in blood serum. *Biosensors & bioelectronics*. 1999. Vol. 14. № 3. P. 283–287.

38. Pfeiffer D., Ralis E. V, Makower A., Scheller F. W. Amperometric bi-enzyme based biosensor for the detection of lactose-characterization and application.

Journal of chemical technology and biotechnology. Oxford, Oxfordshire. 1990. Vol. 49. № 3. P. 255–65.

39. Nguyen B., Vu H., Nguyen C., Nguyen D. T., Nguyen L. T., Vu T. T., Tran L. D. Development of label-free electrochemical lactose biosensor based on graphene/poly(1,5-diaminonaphthalene) film. *Current Applied Physics*. 2016. Vol. 16. № 2. P. 135–140.

40. Marrakchi M., Dzyadevych S. V., Lagarde F., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. Conductometric biosensor based on glucose oxidase and beta-galactosidase for specific lactose determination in milk. *Materials Science and Engineering: C*. 2008. Vol. 28. № 5–6. P. 872–875.

41. Jasti L. S., Dola S. R., Fadnavis N. W., Addepally U., Daniels S., Ponrathnam S. Co-immobilized glucose oxidase and β -galactosidase on bovine serum albumin coated allyl glycidyl ether (AGE)–ethylene glycol dimethacrylate (EGDM) copolymer as a biosensor for lactose determination in milk. *Enzyme and Microbial Technology*. 2014. Vol. 64–65. P. 67–73.

42. Göktuğ T., Sezgintürk M. K., Dinçkaya E. Glucose oxidase- β -galactosidase hybrid biosensor based on glassy carbon electrode modified with mercury for lactose determination. *Analytica Chimica Acta*. 2005. Vol. 551. № 1–2. P. 51–56.

43. Ammam M., Fransaer J. Two-enzyme lactose biosensor based on β -galactosidase and glucose oxidase deposited by AC-electrophoresis: Characteristics and performance for lactose determination in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2010. Vol. 148. № 2. P. 583–589.

44. Yang C., Zhang Z., Shi Z., Xue P., Chang P., Yan R. Application of a novel co-enzyme reactor in chemiluminescence flow-through biosensor for determination of lactose. *Talanta*. 2010. Vol. 82. № 1. P. 319–324.

45. Pilloton R., Mascini M. Flow analysis of lactose and glucose in milk with an improved electrochemical biosensor. *Food Chemistry*. 1990. Vol. 36. № 3. P. 213–222.

46. Jenkins D. M., Delwiche M. J. Adaptation of a manometric biosensor to measure glucose and lactose. *Biosensors and Bioelectronics*. 2003. Vol. 18. № 1. P. 101–107.
47. Liu H., Li H., Ying T., Sun K., Qin Y., Qi D. Amperometric biosensor sensitive to glucose and lactose based on co-immobilization of ferrocene, glucose oxidase, β -galactosidase and mutarotase in β -cyclodextrin polymer. *Analytica Chimica Acta*. 1998. Vol. 358. № 2. P. 137–144.
48. Sharma S. K., Leblanc R. M. Biosensors based on β -galactosidase enzyme: Recent advances and perspectives. *Analytical Biochemistry*. 2017. Vol. 535. P. 1–11.
49. Guémas Y., Boujtita M., Murr N. Biosensor for determination of glucose and sucrose in fruit juices by flow injection analysis. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2000. Vol. 89. № 2–3. P. 171–81.
50. Stredansky M., Redivo L., Magdolen P., Stredansky A., Navarini L. Rapid sucrose monitoring in green coffee samples using multienzymatic biosensor. *Food Chemistry*. 2018. Vol. 254. P. 8–12.
51. Gouda M. D., Kumar M. A., Thakur M. S., Karanth N. G. Enhancement of operational stability of an enzyme biosensor for glucose and sucrose using protein based stabilizing agents. *Biosensors and Bioelectronics*. 2002. Vol. 17. № 6–7. P. 503–507.
52. Haghghi B., Varma S., Alizadeh Sh F. M., Yigzaw Y., Gorton L. Prussian blue modified glassy carbon electrodes-study on operational stability and its application as a sucrose biosensor. *Talanta*. 2004. Vol. 64. № 1. P. 3–12.
53. Hu W., Zhang X., Zhang X., Hu S. Study on multiple-enzyme electrode for sucrose determination. *Chinese journal of biotechnology*. 1991. Vol. 7. № 4. P. 293–300.
54. Surareungchai W., Worasing S., Sritongkum P., Tanticharoen M., Kirtikara K. Dual electrode signal-subtracted biosensor for simultaneous flow injection

determination of sucrose and glucose. *Analytica Chimica Acta*. 1999. Vol. 380. № 1. P. 7–15.

55. Mizutani F., Yabuki S. Rapid determination of glucose and sucrose by an amperometric glucose-sensing electrode combined with an invertase/mutarotase-attached measuring cell. *Biosensors and Bioelectronics*. 1997. Vol. 12. № 9–10. P. 1013–1020.

56. Lima Filho J. L., Pandey P. C., Weetall H. H. An amperometric flow injection analysis enzyme sensor for sucrose using a tetracyanoquinodimethane modified graphite paste electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 1996. Vol. 11. № 8. P. 719–723.

57. Turner A., Karube I., Heineman W., Schmid R., Haginoya R., Suzuki M., Tamiya E., Karube I. Development of a needle type biosensor for analysis of sugars in fruits. *Biosensors*. 1992. P. 142–148.

58. Mansur H. S., Mansur A. A. P., Marques M. E. Multi-enzymatic Systems with Designed 3D Architectures for Constructing Food Bioanalytical Sensors. *Food Analytical Methods*. 2014. Vol. 7. № 6. P. 1166–1178.

59. Mohammadi H., Amine A., Cosnier S., Mousty C. Mercury–enzyme inhibition assays with an amperometric sucrose biosensor based on a trienzymatic-clay matrix. *Analytica Chimica Acta*. 2005. Vol. 543. № 1–2. P. 143–149.

60. 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. № 1. P. 25–30.

61. Bagal D., Karve M., Kakade B., Pillai V. Invertase inhibition based electrochemical sensor for the detection of heavy metal ions in aqueous system: Application of ultra-microelectrode to enhance sucrose biosensor's sensitivity. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008. Vol. 24. № 4. P. 657–664.

62. Bertocchi P., Ciranni E., Compagnone D., Magearu V., Palleschi G., Pirvutoiu S., Valvo L. Flow injection analysis of mercury (II) in pharmaceuticals based on enzyme inhibition and biosensor detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1999. Vol. 20. № 1–2. P. 263–269.
63. Barlíková A., Švorc J., Miertuš S. Hybrid biosensor for the determination of sucrose. *Analytica Chimica Acta*. 1991. Vol. 247. № 1. P. 83–87.
64. Gülce H., Çelebi S. S., Özyörük H., Yildiz A. Amperometric enzyme electrode for sucrose determination prepared from glucose oxidase and invertase co-immobilized in poly(vinylferrocenium). *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1995. Vol. 397. № 1–2. P. 217–223.
65. Sevilla F., Kullick T., Scheper T. A bio-FET sensor for lactose based on co-immobilized β -galactosidase/glucose dehydrogenase. *Biosensors and Bioelectronics*. 1994. Vol. 9. № 4–5. P. 275–281.
66. Vargas E., Gamella M., Campuzano S., Guzmán-Vázquez de Prada A., Ruiz M. A., Reviejo A. J., Pingarrón J. M. Development of an integrated electrochemical biosensor for sucrose and its implementation in a continuous flow system for the simultaneous monitoring of sucrose, fructose and glucose. *Talanta*. 2013. Vol. 105. P. 93–100.
67. Filipiak M., Fludra K., Gościmińska E. Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of an oxygen electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 1996. Vol. 11. № 4. P. 355–364.
68. Aoki K., Uchida H., Katsube T., Ishimaru Y., Iida T. Integration of bienzymatic disaccharide sensors for simultaneous determination of disaccharides by means of light addressable potentiometric sensor. *Analytica Chimica Acta*. 2002. Vol. 471. № 1. P. 3–12.
69. Winartasaputra H., Kuan S. S., Guilbault G. G. Amperometric enzymic determination of triglycerides in serum. *Analytical Chemistry*. 1982. Vol. 54. № 12. P. 1987–1990.

70. 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.
71. Jeong C. Y., Han Y. D., Yoon J. H., Yoon H. C. Bioelectrocatalytic sensor for triglycerides in human skin sebum based on enzymatic cascade reaction of lipase, glycerol kinase and glycerophosphate oxidase. *Journal of Biotechnology*. 2014. Vol. 175. P. 7–14.
72. Pundir C. S., Narwal V. Biosensing methods for determination of triglycerides: A review. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018. Vol. 100. P. 214–227.
73. Huang Y., Cui L., Xue Y., Zhang S., Zhu N., Liang J., Li G. Ultrasensitive cholesterol biosensor based on enzymatic silver deposition on gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrode. *Materials Science and Engineering: C*. 2017. Vol. 77. P. 1–8.
74. Rahim M., Govender-Hondros G., Adeloju S. A single step electrochemical integration of gold nanoparticles, cholesterol oxidase, cholesterol esterase and mediator with polypyrrole films for fabrication of free and total cholesterol nanobiosensors. *Talanta*. 2018. Vol. 189. P. 418–428.
75. Aggarwal V., Malik J., Prashant A., Jaiwal P., Pundir C. Amperometric determination of serum total cholesterol with nanoparticles of cholesterol esterase and cholesterol oxidase. *Analytical Biochemistry*. 2016. Vol. 500. P. 6–11.
76. Basu A., Chattopadhyay P., Roychoudhuri U., Chakraborty R. Development of cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on oxygen electrode for the determination of total cholesterol in food samples. *Bioelectrochemistry*. 2007. Vol. 70. № 2. P. 375–379.
77. Singh S., Chaubey A., Malhotra B. Amperometric cholesterol biosensor based on immobilized cholesterol esterase and cholesterol oxidase on conducting polypyrrole films. *Analytica Chimica Acta*. 2004. Vol. 502. № 2. P. 229–234.
78. Singh S., Solanki P., Pandey M., Malhotra B. Covalent immobilization of

cholesterol esterase and cholesterol oxidase on polyaniline films for application to cholesterol biosensor. *Analytica Chimica Acta*. 2006. Vol. 568. № 1–2. P. 126–132.

79. Huang Y., Tan J., Cui L., Zhou Z., Zhou S., Zhang Z., Zheng R., Xue Y., Zhang M., Li S., Zhu N., Liang J., Li G., Zhong L., Zhao Y. Graphene and Au NPs co-mediated enzymatic silver deposition for the ultrasensitive electrochemical detection of cholesterol. *Biosensors and Bioelectronics*. 2018. Vol. 102. P. 560–567.

80. Singh S., Singhal R., Malhotra B. D. Immobilization of cholesterol esterase and cholesterol oxidase onto sol–gel films for application to cholesterol biosensor. *Analytica Chimica Acta*. 2007. Vol. 582. № 2. P. 335–343.

81. Fang C., He J., Chen Z. A disposable amperometric biosensor for determining total cholesterol in whole blood. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2011. Vol. 155. № 2. P. 545–550.

82. Arya S., Datta M., Malhotra B. Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008. Vol. 23. № 7. P. 1083–1100.

83. Liu Q., Wang J., Boyd B. J. Peptide-based biosensors. *Talanta*. 2015. Vol. 136. P. 114–127.

84. Karimzadeh A., Hasanzadeh M., Shadjou N., Guardia M. Peptide based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2018. Vol. 107. P. 1–20.

85. Setford S. J., White S. F., Bolbot J. A. Measurement of protein using an electrochemical bi-enzyme sensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2002. Vol. 17. № 1–2. P. 79–86.

86. Mutlu S., Alp B., Özmelles R., Mutlu M. Amperometric determination of enzymatic activity by multienzyme biosensors. *Journal of Food Engineering*. 1997. Vol. 33. № 1–2. P. 81–86.

87. Nagy G., Xu C., Buck R., Lindner E., Neuman M., Sprinkle R. Wet and dry chemistry kits for total creatine kinase activity using a microfabricated, planar,

small-volume, amperometric cell. *Analytica Chimica Acta*. 1998. Vol. 377. № 1. P. 1–12.

88. Kwan R., Chan C., Renneberg R. An amperometric biosensor for determining amino acids using a bienzymatic system containing amino acid oxidase and protease. *Biotechnology Letters*. 2002. Vol. 24. № 14. P. 1203–1207.

89. Liu C.-X., Jiang L.-Y., Wang H., Guo Z.-H., Cai X.-X. A novel disposable amperometric biosensor based on trienzyme electrode for the determination of total creatine kinase. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2007. Vol. 122. № 1. P. 295–300.

90. Vanegas D., Clark G., Cannon A., Roux S., Chaturvedi P., McLamore E. A self-referencing biosensor for real-time monitoring of physiological ATP transport in plant systems. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015. Vol. 74. P. 37–44.

91. Palygin O., Levchenko V., Evans L. C., Blass G., Cowley A., Staruschenko A. Use of Enzymatic Biosensors to Quantify Endogenous ATP or H₂O₂ in the Kidney. *Journal of Visualized Experiments*. 2015. № 104. P. 53059.

92. Wang C., Huang C., Lin W. Optical ATP biosensor for extracellular ATP measurement. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013. Vol. 43. P. 355–361.

93. Llaudet E., Hatz S., Droniou M., Dale N. Microelectrode biosensor for real-time measurement of ATP in biological tissue. *Analytical chemistry*. 2005. Vol. 77. № 10. P. 3267–73.

94. Katsu T., Yang X., Rechnitz G. Amperometric biosensor for adenosine-5'-triphosphate based on a platinum-dispersed carbon paste enzyme electrode. *Analytical Letters*. 1994. Vol. 27. № 7. P. 1215–1224.

95. Han Y. D., Song S. Y., Lee J. H., Lee D. S., Yoon H. C. Multienzyme-modified biosensing surface for the electrochemical analysis of aspartate transaminase and alanine transaminase in human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011. Vol. 400. № 3. P. 797–805.

96. Eshkenazi I., Maltz E., Zion B., Rishpon J. A three-cascaded-enzymes

biosensor to determine lactose concentration in raw milk. *Journal of Dairy Science*. 2000. Vol. 83. № 9. P. 1939–1945.

97. Tkáč J., Sturdík E., Gemeiner P. Novel glucose non-interference biosensor for lactose detection based on galactose oxidase-peroxidase with and without co-immobilised beta-galactosidase. *The Analyst*. 2000. Vol. 125. № 7. P. 1285–1289.

98. Rashidi K., Mahmoudi M., Mohammadi G., Zangeneh M., Korani S., Goicoechea H., Gu H.-W., Jalalvand A. Simultaneous co-immobilization of three enzymes onto a modified glassy carbon electrode to fabricate a high-performance amperometric biosensor for determination of total cholesterol. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018. Vol. 120. P. 587–595.

99. Ahmadalinezhad A., Chen A. High-performance electrochemical biosensor for the detection of total cholesterol. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011. Vol. 26. № 11. P. 4508–4513.

100. Conzuelo F., Gamella M., Campuzano S., Ruiz M., Reviejo A., Pingarrón J. An Integrated amperometric biosensor for the determination of lactose in milk and dairy products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. Vol. 58. № 12. P. 7141–7148.

101. Hall S. B., Khudaish E. A., Hart A. L. Electrochemical oxidation of hydrogen peroxide at platinum electrodes. Part 1. An adsorption-controlled mechanism. *Electrochimica Acta*. 1998. Vol. 43. № 5–6. P. 579–588.

102. Larsson N., Ruzgas T., Gorton L., Kokaia M., Kissinger P., Csöregi E. Design and development of an amperometric biosensor for acetylcholine determination in brain microdialysates. *Electrochimica Acta*. 1998. Vol. 43. № 23. P. 3541–3554.

103. Salinas-Castillo A., Pastor I., Mallavia R., Mateo C. R. Immobilization of a trienzymatic system in a sol–gel matrix: A new fluorescent biosensor for xanthine. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008. Vol. 24. № 4. P. 1053–1056.

104. Nikitina O., Shleev S., Gayda G., Demkiv O., Gonchar M., Gorton L., Csöregi E., Nistor M. Bi-enzyme biosensor based on NAD⁺- and glutathione-dependent

recombinant formaldehyde dehydrogenase and diaphorase for formaldehyde assay. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2007. Vol. 125. № 1. P. 1–9.

105. Monkawa A., Gessei T., Takimoto Y., Jo N., Wada T., Sanari N. Highly sensitive and rapid gas biosensor for formaldehyde based on an enzymatic cycling system. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2015. Vol. 210. P. 241–247.

106. Vargas E., Ruiz M. A., Ferrero F. J., Campuzano S., Ruiz-Valdepeñas Montiel V., Reviejo A. J., Pingarrón J. M. Automatic bionalyzer using an integrated amperometric biosensor for the determination of L-malic acid in wines. *Talanta*. 2016. Vol. 158. P. 6–13.

107. Giménez-Gómez P., Gutiérrez-Capitán M., Capdevila F., Puig-Pujol A., Fernández-Sánchez C., Jiménez-Jorquera C. Robust l-malate bienzymatic biosensor to enable the on-site monitoring of malolactic fermentation of red wines. *Analytica Chimica Acta*. 2017. Vol. 954. P. 105–113.

108. Katrlík J., Pizzariello A., Mastihuba V., Švorc J., Stred'anský M., Miertuš S. Biosensors for L-malate and L-lactate based on solid binding matrix. *Analytica Chimica Acta*. 1999. Vol. 379. № 1–2. P. 193–200.

109. Vargas E., Ruiz M. A., Campuzano S., Rivera G. G. de, López-Colino F., Reviejo A. J., Pingarrón J. M. Implementation of a new integrated d-lactic acid biosensor in a semiautomatic FIA system for the simultaneous determination of lactic acid enantiomers. Application to the analysis of beer samples. *Talanta*. 2016. Vol. 152. P. 147–154.

110. Pilas J., Mariano K., Keusgen M., Selmer T., Schöning M. Optimization of an enzyme-based multi-parameter biosensor for monitoring biogas processes. *Procedia Engineering*. 2015. Vol. 120. P. 532–535.

111. Tap H., Gros P., Gué A. An amperometric silicon-based biosensor for d-lactate. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2000. Vol. 68. № 1–3. P. 123–127.

112. Gros P., Comtat M. A bioelectrochemical polypyrrole-containing Fe(CN)₆³⁻ interface for the design of a NAD-dependent reagentless biosensor. *Biosensors and*

Bioelectronics. 2004. Vol. 20. № 2. P. 204–210.

113. Gros P., Durliat H., Comtat M. Use of polypyrrole film containing Fe(CN)₆³⁻ – as pseudo-reference electrode: application for amperometric biosensors. *Electrochimica Acta*. 2001. Vol. 46. № 5. P. 643–650.

114. Wang Z., Etienne M., Quilès F., Kohring G., Walcarius A. Durable cofactor immobilization in sol–gel bio-composite thin films for reagentless biosensors and bioreactors using dehydrogenases. *Biosensors and Bioelectronics*. 2012. Vol. 32. № 1. P. 111–117.

115. Tatsuma T., Watanabe T. Enzyme monolayer- and bilayer-modified electrodes with diaphorase and dehydrogenases. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. 1991. Vol. 310. № 1–2. P. 149–157.

116. Shoji A., Takahashi Y., Osato S., Sugawara M. An enzyme-modified capillary as a platform for simultaneous fluorometric detection of d-glucose and l-lactate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019. Vol. 163. P. 1–8.

117. Šefčovičová J., Vikartovská A., Pätoprstý V., Magdolen P., Katrlík J., Tkac J., Gemeiner P. Off-line FIA monitoring of d-sorbitol consumption during l-sorbose production using a sorbitol biosensor. *Analytica Chimica Acta*. 2009. Vol. 644. № 1–2. P. 68–71.

118. Antiochia R., Gorton L. Development of a carbon nanotube paste electrode osmium polymer-mediated biosensor for determination of glucose in alcoholic beverages. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007. Vol. 22. № 11. P. 2611–2617.

119. Katrlík J., Mastihuba V., Voštiar I., Šefčovičová J., Štefuca V., Gemeiner P. Amperometric biosensors based on two different enzyme systems and their use for glycerol determination in samples from biotechnological fermentation process. *Analytica Chimica Acta*. 2006. Vol. 566. № 1. P. 11–18.

120. Šefčovičová J., Katrlík J., Štefuca V., Mastihuba V., Voštiar I., Greif G., Bučko M., Tkac J., Gemeiner P. A filtration probe-free on-line monitoring of glycerol during fermentation by a biosensor device. *Enzyme and Microbial*

Technology. 2008. Vol. 42. № 5. P. 434–439.

121. Kronkvist K., Wallentin K., Johansson G. Selective enzyme amplification of NAD⁺/NADH using coimmobilized glycerol dehydrogenase and diaphorase with amperometric detection. *Analytica Chimica Acta*. 1994. Vol. 290. № 3. P. 335–342.

122. Katrlík J., Švorc J., Stred'anský M., Miertuš S. Composite alcohol biosensors based on solid binding matrix. *Biosensors and Bioelectronics*. 1998. Vol. 13. № 2. P. 181–191.

123. Radoi A., Compagnone D. Recent advances in NADH electrochemical sensing design. *Bioelectrochemistry*. 2009. Vol. 76. № 1–2. P. 126–134.

124. Noguer T., Marty J.-L. High sensitive bienzymic sensor for the detection of dithiocarbamate fungicides. *Analytica Chimica Acta*. 1997. Vol. 347. № 1–2. P. 63–70.

125. Marty J. L., Noguer T. Bienzyme amperometric sensor for the detection of dithiocarbamate fungicides. *Analisis*. 1993. Vol. 21. № 5. P. 231–233.

126. Creanga C., Murr N. El. Development of new disposable NADH biosensors based on NADH oxidase. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2011. Vol. 656. № 1–2. P. 179–184.

127. Muresan L., Nistor M., Csoregi E., Popescu C. Reagentless amperometric biosensor for NADH detection. *Revue Roumaine de Chimie*. 2009. Vol. 54. № 9. P. 755–760.

128. Radoi A., Compagnone D., Devic E., Palleschi G. Low potential detection of NADH with Prussian Blue bulk modified screen-printed electrodes and recombinant NADH oxidase from *Thermus thermophilus*. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2007. Vol. 121. № 2. P. 501–506.

129. Lomillo M. A., Campo F. J., Pascual F. J. M. Preliminary contribution to the quantification of hmf in honey by electrochemical biosensor chips. *Electroanalysis*. 2006. Vol. 18. № 24. P. 2435–2440.

130. Ghica M., Pauliukaite R., Marchand N., Devic E., Brett C. An improved biosensor for acetaldehyde determination using a bienzymatic strategy at poly(neutral red) modified carbon film electrodes. *Analytica Chimica Acta*. 2007. Vol. 591. № 1. P. 80–86.
131. Rejeb I., Arduini F., Amine A., Gargouri M., Palleschi G. Amperometric biosensor based on Prussian Blue-modified screen-printed electrode for lipase activity and triacylglycerol determination. *Analytica Chimica Acta*. 2007. Vol. 594. № 1. P. 1–8.
132. Koide S., Ito N., Karube I. Development of a micro-planar amperometric bile acid biosensor for urinalysis. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007. Vol. 22. № 9–10. P. 2079–2085.
133. Verma N., Singh A., Singh M. L-arginine biosensors: A comprehensive review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2017. Vol. 12. P. 228–239.
134. Saiapina O. Y., Dzyadevych S. V., Jaffrezic-Renault N. Potentiality of application of the conductometric L-arginine biosensors for the real sample analysis. *Biopolymers and Cell*. 2012. Vol. 28. № 6. P. 441–448.
135. Saiapina O. Y., Dzyadevych S. V., Jaffrezic-Renault N., Soldatkin O. P. Development and optimization of a novel conductometric bi-enzyme biosensor for l-arginine determination. *Talanta*. 2012. Vol. 92. № 1. P. 58–64.
136. Stasyuk N., Smutok O., Gayda G., Vus B., Koval'chuk Y., Gonchar M. Bi-enzyme l-arginine-selective amperometric biosensor based on ammonium-sensing polyaniline-modified electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2012. Vol. 37. № 1. P. 46–52.
137. Cui Y. Amperometric ATP biosensors based on coimmobilizations of p-hydroxybenzoate hydroxylase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and hexokinase on clark-type and screen-printed electrodes. *IEEE Sensors Journal*. 2010. Vol. 10. № 5. P. 979–983.
138. Cui Y., Barford J., Renneberg R. Amperometric trienzyme ATP biosensors

based on the coimmobilization of salicylate hydroxylase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and hexokinase. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2008. Vol. 132. № 1. P. 1–4.

139. Wollenberger U., Scheller F. Enzyme activation for activator and enzyme activity measurement. *Biosensors and Bioelectronics*. 1993. Vol. 8. № 6. P. 291–297.

140. Monošík R., Ukropcová D., Středanský M., Šturdík E. Multienzymatic amperometric biosensor based on gold and nanocomposite planar electrodes for glycerol determination in wine. *Analytical Biochemistry*. 2012. Vol. 421. № 1. P. 256–261.

141. Kucherenko I. S., Soldatkin O. O., Lagarde F., Jaffrezic-Renault N., Dzyadevych S. V., 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. № 12. P. 604–611.

142. Serafín V., Hernández P., Agüí L., Yáñez-Sedeño P., Pingarrón J. Electrochemical biosensor for creatinine based on the immobilization of creatininase, creatinase and sarcosine oxidase onto a ferrocene/horseradish peroxidase/gold nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes/Teflon composite electrode. *Electrochimica Acta*. 2013. Vol. 97. P. 175–183.

143. Volotovskiy V., Kim N. Multienzyme Inhibition Biosensor for Amygdalin Measurement. *Electroanalysis*. 1998. Vol. 10. № 7. P. 512–514.

144. Wollenberger U., Schubert F., Pfeiffer D., Scheller F. W. Enhancing biosensor performance using multienzyme systems. *Trends in Biotechnology*. 1993. Vol. 11. № 6. P. 255–262.

145. Schubert F., Kirstein D., Scheller F., Appleqvist R., Gorton L., Johansson G. Enzyme electrodes for l-glutamate using chemical redox mediators and enzymatic substrate amplification. *Analytical Letters*. 1986. Vol. 19. № 11–12. P. 1273–1288.

146. Huang T., Warsinke A., Kuwana T., Scheller F. Determination of l-

phenylalanine based on an NADH-detecting biosensor. *Analytical Chemistry*. 1998. Vol. 70. № 5. P. 991–997.

147. Chaubey A., Pande K., Pandey M., Singh V. Signal amplification by substrate recycling on polyaniline/lactate oxidase/lactate dehydrogenase bienzyme electrodes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2001. Vol. 96. № 1–3. P. 239–248.

148. Ghindilis A., Makower A., Bauer C., Bier F., Scheller F. Determination of p-aminophenol and catecholamines at picomolar concentrations based on recycling enzyme amplification. *Analytica Chimica Acta*. 1995. Vol. 304. № 1. P. 25–31.

149. Conrath N., Gründig B., Hüwel S., Cammann K. A novel enzyme sensor for the determination of inorganic phosphate. *Analytica Chimica Acta*. 1995. Vol. 309. № 1–3. P. 47–52.

150. Pfeiffer D., Scheller F., Janchen M., Bertermann K. Glucose oxidase bienzyme electrodes for ATP, NAD⁺, starch and disaccharides. *Biochimie*. 1980. Vol. 62. № 8–9. P. 587–93.

151. Yarman A., Schulz C., Sygmund C., Ludwig R., Gorton L., Wollenberger U., Scheller F. Third generation ATP sensor with enzymatic analyte recycling. *Electroanalysis*. 2014. Vol. 26. № 9. P. 2043–2048.

152. Lisdat F., Wollenberger U., Makower A., Hörtnagl H., Pfeiffer D., Scheller F. Catecholamine detection using enzymatic amplification. *Biosensors and Bioelectronics*. 1997. Vol. 12. № 12. P. 1199–1211.

153. Molinnus D., Sorich M., Bartz A., Siegert P., Willenberg H., Lisdat F., Poghossian A., Keusgen M., Schöning M. Towards an adrenaline biosensor based on substrate recycling amplification in combination with an enzyme logic gate. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016. Vol. 237. P. 190–195.

154. Diaconu M., Litescu S., Radu G. Bienzymatic sensor based on the use of redox enzymes and chitosan–MWCNT nanocomposite. Evaluation of total phenolic content in plant extracts. *Microchimica Acta*. 2011. Vol. 172. № 1–2. P. 177–184.

155. Schubert F., Kirstein D., Schröder K., Scheller F. Enzyme electrodes with substrate and co-enzyme amplification. *Analytica Chimica Acta*. 1985. Vol. 169. P. 391–396.
156. Coche-Guérente L., Desprez V., Diard J.-P., Labbé P., Therias S. Amplification of amperometric biosensor responses by electrochemical substrate recycling: Part II. Experimental study of the catechol–polyphenol oxidase system immobilized in a laponite clay matrix. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1999. Vol. 470. № 1. P. 53–60.
157. Coche-Guerente L., Labbé P., Mengeaud V. Amplification of amperometric biosensor responses by electrochemical substrate recycling. Theoretical and experimental study of the phenol–polyphenol oxidase system immobilized in laponite hydrogels and layer-by-layer self-assembled structures. *Analytical Chemistry*. 2001. Vol. 73. № 14. P. 3206–3218.
158. Khlyntseva S., Bazel' Y., Vishnikin A., Andruch V. Methods for the determination of adenosine triphosphate and other adenine nucleotides. *Journal of Analytical Chemistry*. 2009. Vol. 64. № 7. P. 657–673.
159. Compagnone D., Guilbault G. Glucose oxidase/hexokinase electrode for the determination of ATP. *Analytica Chimica Acta*. 1997. Vol. 340. № 1–3. P. 109–113.
160. Kueng A., Kranz C., Mizaikoff B. Amperometric ATP biosensor based on polymer entrapped enzymes. *Biosensors & bioelectronics*. 2004. Vol. 19. № 10. P. 1301–1307.
161. Liu S., Sun Y. Co-immobilization of glucose oxidase and hexokinase on silicate hybrid sol-gel membrane for glucose and ATP detections. *Biosensors & bioelectronics*. 2007. Vol. 22. № 6. P. 905–911.
162. 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. № 3.

P. 1023–1028.

163. Patel B., Rogers M., Wieder T., O'Hare D., Boutelle M. ATP microelectrode biosensor for stable long-term in vitro monitoring from gastrointestinal tissue. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011. Vol. 26. № 6. P. 2890–2896.

164. Ziller C., Lin J., Knittel P., Friedrich L., Andronescu C., Pöller S., Schuhmann W., Kranz C. Poly(benzoxazine) as an immobilization matrix for miniaturized atp and glucose biosensors. *ChemElectroChem*. 2017. Vol. 4. № 4. P. 864–871.

165. Masson J., Kranz C., Mizaikoff B., Gauda E. Amperometric ATP microbiosensors for the analysis of chemosensitivity at rat carotid bodies. *Analytical Chemistry*. 2008. Vol. 80. № 11. P. 3991–3998.

166. Cavallini A., Micheli G., Carrara S. Comparison of Three methods of biocompatible multi-walled carbon nanotubes confinement for the development of implantable amperometric adenosine-5'-triphosphate biosensors. *Sensor Letters*. 2011. Vol. 9. № 5. P. 1838–1844.

167. Davis G., Green M., Hill H. A. Detection of ATP and creatine kinase using an enzyme electrode. *Enzyme and Microbial Technology*. 1986. Vol. 8. № 6. P. 349–352.

168. Weber C., Gauda E., Mizaikoff B., Kranz C. Developmental aspects of amperometric ATP biosensors based on entrapped enzymes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009. Vol. 395. № 6. P. 1729–1735.

169. 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.

170. Uzunoglu A., Ramirez I., Andreasen E., Stanciu L. A. Layer by layer construction of ascorbate interference-free amperometric lactate biosensors with lactate oxidase, ascorbate oxidase, and ceria nanoparticles. *Microchimica Acta*. 2016. Vol. 183. № 5. P. 1667–1675.

171. Nieh C., Kitazumi Y., Shirai O., Kano K. Sensitive D-amino acid biosensor

based on oxidase/oxidase system mediated by pentacyanoferrate-bound polymer. *Biosensors and Bioelectronics*. 2013. Vol. 47. P. 350–355.

172. Rahman M. A., Lee K.-S., Park D.-S., Won M.-S., Shim Y.-B. An amperometric bilirubin biosensor based on a conductive poly-terthiophene–Mn(II) complex. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008. Vol. 23. № 6. P. 857–864.

173. Rahman M. A., Kwon N.-H., Won M.-S., Choe E. S., Shim Y.-B. functionalized conducting polymer as an enzyme-immobilizing substrate: an amperometric glutamate microbiosensor for in vivo measurements. *Analytical Chemistry*. 2005. Vol. 77. № 15. P. 4854–4860.

174. Yamamoto K., Zeng H., Shen Y., Ahmed M., Kato T. Evaluation of an amperometric glucose biosensor based on a ruthenium complex mediator of low redox potential. *Talanta*. 2005. Vol. 66. № 5. P. 1175–1180.

175. Jawaheer S., White S., Rughooputh S. D., Cullen D. C. Development of a common biosensor format for an enzyme based biosensor array to monitor fruit quality. *Biosensors and Bioelectronics*. 2003. Vol. 18. № 12. P. 1429–1437.

176. Anzai J., Takeshita H., Hoshi T., Osa T. Elimination of ascorbate interference of glucose biosensors by use of enzyme multilayers composed of avidin and biotin-labeled glucose oxidase and ascorbate oxidase. *Denki Kagaku*. 1995. Vol. 63. № 12. P. 1141–1142.

177. Nakamoto K., Kurita R., Niwa O. One-chip biosensor for simultaneous disease marker/calibration substance measurement in human urine by electrochemical surface plasmon resonance method. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010. Vol. 26. № 4. P. 1536–1542.

178. Salinas E., Rivero V., Torriero A. A., Benuzzi D., Sanz M. I., Raba J. Multienzymatic-rotating biosensor for total cholesterol determination in a FIA system. *Talanta*. 2006. Vol. 70. № 2. P. 244–250.

179. Hung Tzang C., Yuan R., Yang M. Voltammetric biosensors for the determination of formate and glucose-6-phosphate based on the measurement of

dehydrogenase-generated NADH and NADPH. *Biosensors and Bioelectronics*. 2001. Vol. 16. № 3. P. 211–219.

180. Volotovskyy V., Kim N. Ion-sensitive field effect transistor-based multienzyme sensor for alternative detection of mercury ions, cyanide, and pesticide. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2003. Vol. 13. № 3. P. 373–377.

181. Кучеренко І.С. , Солдаткін О.О., Озансой Касап Б., Аката Б., Солдаткін О.П. Використання силікалітів з різним розміром частинок при створенні ферментних кондуктометричних біосенсорів. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2013. Vol. 10. № 1. P. 60–69.

182. Kucherenko I. S., Soldatkin O. O., Kasap B. O., Öztürk S., Akata B., Soldatkin A. P., Dzyadevych S. V. Elaboration of urease adsorption on silicalite for biosensor creation. *Electroanalysis*. 2012. Vol. 24, № 6. P. 1380–1385.

183. Soldatkin A. P., Dzyadevych S. V., Korpan, Y. I., Arkhipova V. N., Zhylyak G. A., Piletsky S. A., Sergeeva T. A., Panasyuk T. L., El'skaya A. V. Biosensors based on conductometric detection. *Biopolymers Cell*. 1998. № 14. P. 268–277.

184. Солдаткін О.О., Назаренко О.А., Павлюченко О.С., Кукла О.Л., Архіпова В.М., Дзядевич С.В., Солдаткін О.П., Єльська Г. В. Оптимізація роботи ферментних біоселективних елементів в складі потенціометричного мультибіосенсора. *Біополімери і клітина*. 2008. Vol. 24. № 1.

185. Yin L.-T., Lin Y.-T., Leu Y.-C., Hu C.-Y. Enzyme immobilization on nitrocellulose film for pH-EGFET type biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2010. Vol. 148. № 1. P. 207–213.

186. Soldatkin A., Montoriol J., Sant W., Martelet C., Jaffrezic-Renault N. A novel urea sensitive biosensor with extended dynamic range based on recombinant urease and ISFETs. *Biosensors & bioelectronics*. 2003. Vol. 19. № 2. P. 131–5.

187. Мельник В. Г., Василенко А. Д., Дудченко А. Е., Погребняк В. Д. Исследования подавления синфазной помехи в биосенсорной

кондуктометрической системе с дифференциальными датчиками. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2014. Vol. 11. № 3.

188. Hatsuki S., Takuro T., Etsuro I. Ca²⁺ signaling regulated by an ATP-dependent autocrine mechanism in astrocytes. *NeuroReport*. 2001. Vol. 12. № 12.

189. Kucherenko D. Y., Kucherenko I. S., Soldatkin O. O., Soldatkin A. P. Application of glutamate-sensitive biosensor for analysis of foodstuff. *Biotechnologia Acta*. 2018. Vol. 11. № 8. P. 57–67.

190. Kimmel D., LeBlanc G., Meschievitz M., Cliffel D. Electrochemical Sensors and Biosensors. *Analytical Chemistry*. 2012. Vol. 84. № 2. P. 685–707.

191. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. *European Treaty Series*. 1986. № 123. P. 1–11.

192. Дзядевич С. В., Солдаткін О. П. Наукові та технологічні засади створення мініатюрних електрохімічних біосенсорів. *Наукова думка*. Київ. 2006.

193. Official web-site of manufacturer of PalmSens.

194. Official web-site of manufacturer of DropSens.

195. Lowry J., Miele M., O'Neill R., Boutelle M., Fillenz M. An amperometric glucose-oxidase/poly(o-phenylenediamine) biosensor for monitoring brain extracellular glucose: in vivo characterisation in the striatum of freely-moving rats. *Journal of neuroscience methods*. 1998. Vol. 79. № 1. P. 65–74.

196. Lowry J. P., O'Neill R. D. Partial characterization in vitro of glucose oxidase-modified poly(phenylenediamine)-coated electrodes for neurochemical analysis in vivo. *Electroanalysis*. 1994. Vol. 6. № 5–6. P. 369–379.

197. Dixon B. M., Lowry J. P., O'Neill R. D. Characterization in vitro and in vivo of the oxygen dependence of an enzyme/polymer biosensor for monitoring brain glucose. *Journal of neuroscience methods*. 2002. Vol. 119. № 2. P. 135–42.

198. Soldatkin O. O., Schuvailo O. M., Cespuglio R. Soldatkin A. P. Development

of high-sensitive and selective amperometric transducers for biosensors for in vivo analysis. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2010. Vol. 1 (7). № 2. P. 51–60.

199. Zhang Y., Hu Y., Wilson G., Moatti-Sirat D., Poitout V., Reach G. Elimination of the acetaminophen interference in an implantable glucose sensor. *Analytical Chemistry*. 1994. Vol. 66. № 7. P. 1183–1188.

200. Moussy F., Harrison D., O'Brien D., Rajotte R. Performance of subcutaneously implanted needle-type glucose sensors employing a novel trilayer coating. *Analytical chemistry*. 1993. Vol. 65. № 15. P. 2072–2077.

201. Pan S., Arnold M. Selectivity enhancement for glutamate with a Nafion/glutamate oxidase biosensor. *Talanta*. 1996. Vol. 43. № 7. P. 1157–1162.

202. O'Connell P., O'Sullivan C., Guilbault G. Electrochemical metallisation of carbon electrodes. *Analytica Chimica Acta*. 1998. Vol. 373. № 2–3. P. 261–270.

203. Gorton L. A carbon electrode sputtered with palladium and gold for the amperometric detection of hydrogen peroxide. *Analytica Chimica Acta*. 1985. Vol. 178. P. 247–253.

204. Daly D. The use of polymers coupled with metallised electrodes to allow H₂O₂ detection in the presence of electrochemical interferences. *Talanta*. 1999. Vol. 49. № 3. P. 667–678.

205. Yang Q., Atanasov P., Wilkins E. Development of needle-type glucose sensor with high selectivity. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 1998. Vol. 46. № 3. P. 249–256.

206. Sakslund H., Wang J., Lu F., Hammerich O. Development and evaluation of glucose microsensors based on electrochemical codeposition of ruthenium and glucose oxidase onto carbon fiber microelectrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1995. Vol. 397. № 1–2. P. 149–155.

207. Wang J., Angnes L. Miniaturized glucose sensors based on electrochemical codeposition of rhodium and glucose oxidase onto carbon-fiber electrodes.

- Analytical Chemistry. 1992. Vol. 64. № 4. P. 456–459.
208. White S., Turner A., Bilitewski U., Schmid R. Lactate, glutamate and glutamine biosensors based on rhodinized carbon electrodes. *Analytica Chimica Acta*. 1994. Vol. 295. № 3. P. 243–251.
209. Wang J., Chen Q. Enzyme microelectrode array strips for glucose and lactate. *Analytical Chemistry*. 1994. Vol. 66. № 7. P. 1007–1011.
210. O'Neill R. D., Chang S.-C., Lowry J. P., McNeil C. J. Comparisons of platinum, gold, palladium and glassy carbon as electrode materials in the design of biosensors for glutamate. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004. Vol. 19. № 11. P. 1521–1528.
211. Sakslund H., Wang J., Hammerich O. Analysis of the factors determining the sensitivity of a miniaturized glucose biosensor made by codeposition of palladium and glucose oxidase onto an 8 μm carbon fiber. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1996. Vol. 402. № 1–2. P. 149–160.
212. Wang J., Rivas G., Chicharro M. Glucose microsensor based on electrochemical deposition of iridium and glucose oxidase onto carbon fiber electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 1997. Vol. 439. № 1. P. 55–61.
213. Щувайло О.Н., Данилейко Л.В., Архипова В.Н., Дзядевич С.В., Ельская А.В., Сеспуглио Р., Солдаткин А. П. Разработка микробиосенсоров на основе углеродных волокон для определения глюкозы, ацетилхолина и холина *in vivo*. *Биополимеры и клетка*. 2002. Vol. 18. № 6. P. 489–495.
214. Kelly S. C., O'Connell P. J., O'Sullivan C. K., Guilbault G. G. Development of an interferent free amperometric biosensor for determination of l-lysine in food. *Analytica Chimica Acta*. 2000. Vol. 412. № 1–2. P. 111–119.
215. Kelly S., Curulli A., O'Sullivan C., Guilbault G., Palleschi G. A new interference-free lysine biosensor using a non-conducting polymer film. *Biosensors & bioelectronics*. 1998. Vol. 13. № 12. P. 1245–50.
216. Craig J. D., O'Neill R. D. Comparison of simple aromatic amines for

- electrosynthesis of permselective polymers in biosensor fabrication. *The Analyst*. 2003. Vol. 128. № 7. P. 905.
217. Geise R. J., Adams J. M., Barone N. J., Yacynych A. M. Electropolymerized films to prevent interferences and electrode fouling in biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 1991. Vol. 6. № 2. P. 151–160.
218. Murphy L. J. Reduction of interference response at a hydrogen peroxide detecting electrode using electropolymerized films of substituted naphthalenes. *Analytical Chemistry*. 1998. Vol. 70. № 14. P. 2928–2935.
219. Craig J. D., O'Neill R. D. Electrosynthesis and permselective characterisation of phenol-based polymers for biosensor applications. *Analytica Chimica Acta*. 2003. Vol. 495. № 1–2. P. 33–43.
220. Дзядевич С. В. Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування. *Біополімери і клітина*. 2005. Том. 21, № 2. С. 91 – 106.
221. Varlan A., Sansen W. Characterisation of planar electrodes realised in planar microelectronic technology. *Medical & Biological Engineering & Computing*. 1996. Vol. 34. № 4. P. 308–312.
222. Дзядевич С. В., Шульга А. А., Пацковский С. В., Архипова В. Н., Солдаткин А. П. Тонкопленочные кондуктометрические датчики для ферментных биосенсоров. *Электрохимия*. 1994. Том 30. № 8. С. 982–987.
223. Мельник В. Г., Дзядевич С. В., Иващук А. В., Ульянова В. А., Лепих Я. И., Романов В. А. Экспериментальные исследования микроэлектронных датчиков для кондуктометрических биосенсорных систем. *Sensor Electronics and Microsystem technologies*. 2011. Vol. 2. № 8. P. 81–90.
224. Мацишин М. Й., Пешкова В. М., Мельник В. Г., Кукла О. Л., Мамикін А. В., Семеничева Л. М., Дзядевич С. В., Солдаткін О. П. Influence of characteristics of the system thin film transducer – buffer solution on conductometric biosensor functionality. *Sensor Electronics and Microsystem*

- Technologies. 2013. Vol. 10. № 2. P. 73–83.
225. Barsoukov E., Macdonald J. Impedance Spectroscopy: Theory, experiment, and applications. Second Edition. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. 2005. P. 616.
226. Сухотина. М. Справочник по электрохимии. Химия. Ленинград. 1981.
227. Harper A., Anderson M. Electrochemical glucose sensors—developments using electrostatic assembly and carbon nanotubes for biosensor construction. *Sensors*. 2010. Vol. 10. № 9. P. 8248–8274.
228. Sharif A., Tanveer A., Qamar B., Arfan Y., Ghulam M., Sajjad-Urrehman F. Estimation of milk lactose and somatic cells for the diagnosis of sub-clinical mastitis in dairy buffaloes. *International journal of agriculture & biology*. 2007. Vol. 9. № 2. P. 267–270.
229. Paige D., Bayless T., Huang S. Lactose intolerance and lactose hydrolyzed milk. *ACS Symposium Series*. 1975. Vol. 15.
230. Schaafsma G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*. 2008. Vol. 18. № 5. P. 458–465.
231. Amamcharla J K., Metzger L. E. Development of a rapid method for the measurement of lactose in milk using a blood glucose biosensor. *J. Dairy Sci*. 2011. Vol. 94. P. 4800–4809.
232. Aoki K., Suzuki H., Ishimaru Y., Toyama S., Ikariyama Y., Iida T. Thermophilic glucokinase-based sensors for the detection of various saccharides and glycosides. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2005. Vol. 108. № 1–2. P. 727–732.
233. Nelson D.L., Cox M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Fifth edition. W. H. Freeman & Company. New York. 2008.
234. Morris S. M. Arginine: beyond protein. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2006. Vol. 83. № 2. P. 508–512.
235. Wu G., Morris S. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *The*

- Biochemical journal. 1998. Vol. 336. № 1. P. 1–17.
236. Voet D., Voet. J. Biochemistry. 4th Edition. John Wiley & Sons Inc. New York. 2011.
237. Магомедов Г., Олейникова А., Плотникова И., Брехов А. Технология карамели. Гиорд. 2008.
238. Dzyadevych S. V., Shulga A. A., Patskovsky S. V., Arkhipova V. N., Soldatkin A. P. Thin-films conductometric transducer for enzyme biosensors. Russian Journal of Electrochemistry (by Interperiodica, USA). 1994. Vol. 30. № 8. P. 887–891.
239. Ситник К.М. Т. В. О. Біологічний словник. Головна редакція Української Радянської Енциклопедії. Київ. 1986.
240. Cooper J. R., Bloom F. E., Roth R. H. The Biochemical Basis of Neuropharmacology. Oxford University Press. New York. NY. 2003.
241. Торшин И. Ю. Громова О. А. Экспертный анализ данных в молекулярной фармакологии. МЦНМО. Москва. 2015.
242. Wise D. D., Barkhimer T. V, Brault P.-A., Kirchoff J. R., Messer W. S., Hudson R. A. Internal standard method for the measurement of choline and acetylcholine by capillary electrophoresis with electrochemical detection. Journal of Chromatography B. 2002. Vol. 775. № 1. P. 49–56.
243. Upadhyay S., Rao G., Sharma M., Bhattacharya B., Rao V., Vijayaraghavan R. Immobilization of acetylcholinesterase–choline oxidase on a gold–platinum bimetallic nanoparticles modified glassy carbon electrode for the sensitive detection of organophosphate pesticides, carbamates and nerve agents. Biosensors and Bioelectronics. 2009. Vol. 25. № 4. P. 832–838.
244. Guyenet P. G., Javory A. F., Beaujouan J. C., Rossier B. J., Glowinski J. Effects of dopaminergic receptor agonists and antagonists on the activity of the neo-striatal cholinergic system. Brain research. 1975. Vol. 84. № 2. P. 227–244.
245. Haubrich D., Gerber N., Pflueger A., Zweig M. Tissue choline studied using a

- simple chemical assay. *Journal of neurochemistry*. 1981. Vol. 36. № 4. P. 1409–17.
246. Bullock R., Butcher S. P., Chen M. H., Kendall L., McCulloch J. Correlation of the extracellular glutamate concentration with extent of blood flow reduction after subdural hematoma in the rat. *Journal of neurosurgery*. 1991. Vol. 74. № 5. P. 794–802.
247. Murai S., Saito H., Masuda Y., Itsukaichi O., Itoh T. Basal levels of noradrenaline, dopamine, 5-hydroxytryptamine, and acetylcholine in the submandibular, parotid, and sublingual glands of mice and rats. *Archives of oral biology*. 1995. Vol. 40. № 7. P. 663–668.
248. Izaki Y., Hori K., Nomura M. Dopamine and acetylcholine elevation on lever-press acquisition in rat prefrontal cortex. *Neuroscience letters*. 1998. Vol. 258. № 1. P. 33–36.
249. Wester P., Eriksson S., Forsell A., Puu G., Adolfsson R. Monoamine metabolite concentrations and cholinesterase activities in cerebrospinal fluid of progressive dementia patients: relation to clinical parameters. *Acta neurologica Scandinavica*. 1988. Vol. 77. № 1. P. 12–21.
250. Israel H. *Choline and acetylcholine: handbook of chemical assay methods*. First edition. New York, NY: Raven Press. 1974.
251. Gourine A., Llaudet E., Dale N., Spyer K. Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005. Vol. 25. № 5. P. 1211–1218.
252. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2006. Vol. 27. № 3. P. 166–176.
253. Frenguelli B., Wigmore G., Llaudet E., Dale N. Temporal and mechanistic dissociation of ATP and adenosine release during ischaemia in the mammalian hippocampus. *Journal of neurochemistry*. 2007. Vol. 101. № 5. P. 1400–1413.

254. Volotovskiy V., Soldatkin A., Shulga A., Rossokhaty V., Strikha V., Elska A. Glucose-sensitive ion-sensitive field-effect transistor-based biosensor with additional positively charged membrane. Dynamic range extension and reduction of buffer concentration influence on the sensor response. *Analytica Chimica Acta*. 1996. Vol. 322. P. 77–81.
255. Sols A., La Fuente G., Villarpalasi C., Asensio C. Substrate specificity and some other properties of baker's yeast hexokinase. *Biochimica et biophysica acta*. 1958. Vol. 30. № 1. P. 92–101.
256. Hohnadel D., Cooper C. The effect of structural modifications of ATP on the yeast-hexokinase reaction. *European journal of biochemistry*. 1972. Vol. 31. № 1. P. 180–5.
257. Pernot P., Mothet J.-P., Schuvailo O., Soldatkin A., Pollegioni L., Pilone M., Adeline M., Cespuglio R., Marinesco S. Characterization of a yeast D-amino acid oxidase microbiosensor for D-serine detection in the central nervous system. *Analytical chemistry*. 2008. Vol. 80. № 5. P. 1589–1597.
258. Killoran S. J., O'Neill R. D. Characterization of permselective coatings electrosynthesized on Pt–Ir from the three phenylenediamine isomers for biosensor applications. *Electrochimica Acta*. 2008. Vol. 53. № 24. P. 7303–7312.
259. Chen L., Chen Z. A multifunctional label-free electrochemical impedance biosensor for Hg²⁺, adenosine triphosphate and thrombin. *Talanta*. 2015. Vol. 132. P. 664–668.
260. Jia J., Feng J., Chen H. G., Luo H. Q., Li N. A simple electrochemical method for the detection of ATP using target-induced conformational change of dual-hairpin DNA structure. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016. Vol. 222. P. 1090–1095.
261. Zhu L., Liu Y., Yang P., Liu B. Label-free aptasensor based on electrodeposition of gold nanoparticles on graphene and its application in the quantification of adenosine triphosphate. *Electrochimica Acta*. 2015. Vol. 172. P.

88–93.

262. Gotoh M., Tamiya E., Karube I., Kagawa Y. A microsensor for adenosine-5'-triphosphate pH-sensitive field effect transistors. *Analytica Chimica Acta*. 1986. Vol. 187. P. 287–291.

263. Bucking W. An electrochemical biomimetic ATP-sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2005. Vol. 104. № 1. P. 111–116.

264. Migita S., Ozasa K., Tanaka T., Haruyama T. Enzyme-based field-effect transistor for adenosine triphosphate (ATP) sensing. *Analytical sciences: the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*. 2007. Vol. 23. № 1. P. 45–48.

265. Katsu T., Yamanaka K. Potentiometric method for the determination of adenosine-5'-triphosphate. *Analytica Chimica Acta*. 1993. Vol. 276. № 2. P. 373–376.

266. 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.

267. Kucherenko I. S., Didukh D. Y., Soldatkin O. O., Soldatkin A. P. Amperometric biosensor system for simultaneous determination of adenosine-5'-triphosphate and glucose. *Analytical Chemistry*. 2014. Vol. 86. № 11. P. 5455–5462.

268. Shram N. F., Netchiporouk L. I., Martelet C., Jaffrezic-Renault N., Bonnet C., Cespuglio R. In vivo voltammetric detection of rat brain lactate with carbon fiber microelectrodes coated with lactate oxidase. *Analytical Chemistry*. 1998. Vol. 70. № 13. P. 2618–2622.

269. Gautier-Sauvigné S., Colas D., Parmantier P., Clement P., Gharib A., Sarda N., Cespuglio R. Nitric oxide and sleep. *Sleep medicine reviews*. 2005. Vol. 9. № 2. P. 101–113.

270. Boutelle M. G., Fellows L. K., Cook C. Enzyme packed bed system for the on-line measurement of glucose, glutamate, and lactate in brain microdialyzate. *Analytical Chemistry*. 1992. Vol. 64. № 17. P. 1790–1794.
271. Kai K., Morimoto I., Morita E., Okada Y., Yamamoto S., Kanda K., Uriu K., Eto S. Environmental stress modifies glycemic control and diabetes onset in type 2 diabetes prone Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Physiology & behavior*. 2000. Vol. 68. № 4. P. 445–452.
272. Choi D. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*. 1988. Vol. 1. № 8. P. 623–634.
273. Netchiporouk L. I., Shram N. F., Jaffrezic-Renault N., Martelet C., Cespuglio R. In vivo brain glucose measurements: differential normal pulse voltammetry with enzyme-modified carbon fiber microelectrodes. *Analytical chemistry*. 1996. Vol. 68. № 24. P. 4358–4364.
274. Wilson G., Gifford R. Biosensors for real-time in vivo measurements. *Biosensors and Bioelectronics*. 2005. Vol. 20. № 12. P. 2388–2403.
275. Lowry J. P., O'Neill R. D. Homogeneous mechanism of ascorbic acid interference in hydrogen peroxide detection at enzyme-modified electrodes. *Analytical chemistry*. 1992. Vol. 64. № 4. P. 453–456.
276. Hagberg H., Lehmann A., Sandberg M., Nyström B., Jacobson I., Hamberger A. Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International society of cerebral blood flow and metabolism*. 1985. Vol. 5. № 3. P. 413–419.
277. Benveniste H., Drejer J., Schousboe A., Diemer N. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *Journal of neurochemistry*. 1984. Vol. 43. № 5. P. 1369–1374.
278. Wahl F., Obrenovitch T., Hardy A., Plotkine M., Boulu R., Symon L.

- Extracellular glutamate during focal cerebral ischaemia in rats: time course and calcium dependency. *Journal of neurochemistry*. 1994. Vol. 63. № 3. P. 1003–1011.
279. Moreira F., Dutra R., Noronha J., Sales M. Novel sensory surface for creatine kinase electrochemical detection. *Biosensors & bioelectronics*. 2014. Vol. 56. P. 217–222.
280. Lopes R., Lokhnygina Y., Hasselblad V., Newby K., Yow E., Granger C., Armstrong P., Hochman J., Mills J., Ruzyllo W., Mahaffey K. Methods of creatine kinase-MB analysis to predict mortality in patients with myocardial infarction treated with reperfusion therapy. *Trials*. 2013. Vol. 14. № 1. P. 123.
281. Szasz G., Gruber W., Bernt E. Creatine kinase in serum: determination of optimum reaction conditions. *Clinical chemistry*. 1976. Vol. 22. № 5. P. 650–656.
282. Gao H., Leary J. Multiplex inhibitor screening and kinetic constant determinations for yeast hexokinase using mass spectrometry based assays. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 2003. Vol. 14. № 3. P. 173–181.
283. Kosow D. P., Rose I. A. Product inhibition of the hexokinases. *The Journal of biological chemistry*. 1970. Vol. 245. № 1. P. 198–204.
284. Коробкин В. И. Передельский Л. В. Экология. 12-е издание. Феникс. Ростов на Дону. 2007.
285. Скворцов И. Н., Ли С., Ворожейкина И. П. Зависимость некоторых показателей биологической активности почв от уровня концентрации тяжелых металлов. Тяжелые металлы в окружающей среде. - Москва, 1980. С.121-125.
286. F.H. Detergents in the Environment. Marcel Dek-ker. New York:1997.
287. B. N. Biogeochemistry of Chelating Agents. American Chemical Society. Washington. 2005.
288. Nörtemann B. Biodegradation of EDTA. *Applied microbiology and biotechnology*. 1999. Vol. 51. № 6. P. 751–759.

289. Bucheli-Witschel M., Egli T. Environmental fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids. *FEMS microbiology reviews*. 2001. Vol. 25. № 1. P. 69–106.
290. Sýkora V., Pitter P., Bittnerová I., Lederer T. Biodegradability of ethylenediamine-based complexing agents. *Water research*. 2001. Vol. 35. № 8. P. 2010–2016.
291. Nowack B. Environmental chemistry of aminopolycarboxylate chelating agents. *Environmental science & technology*. 2002. Vol. 36. № 19. P. 4009–4016.
292. Osipov A. V, Levashov M. Y., Tsetlin V. I., Utkin Y. N. Cobra venom contains a pool of cysteine-rich secretory proteins. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005. Vol. 328. № 1. P. 177–182.
293. Refsum H., Ueland P., Nygård O., Vollset S. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annual review of medicine*. 1998. Vol. 49. P. 31–62.
294. Seshadri S., Beiser A., Selhub J., Jacques P. F., Rosenberg I. H., D'Agostino R., Wilson P., Wolf P. Plasma homocysteine as a risk factor for dementia and Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*. 2002. Vol. 346. № 7. P. 476–483.
295. Ueland P. M. Homocysteine and folate in pregnancy. *Clinical Chemistry*. 2004. Vol. 50. № 8. P. 1293–1295.
296. Wang W., Rusin O., Xu X., Kim K., Escobedo J., Fakayode S., Fletcher K., Lowry M., Schowalter C., Lawrence C., Fronczek F., Warner I., Strongin R. Detection of homocysteine and cysteine. *Journal of the American Chemical Society*. 2005. Vol. 127. № 45. P. 15949–15958.
297. Carmel R., Jacobsen D. Homocysteine in health and disease. Cambridge University Press. New York. 2001.
298. Meurs J., Dhonukshe-Rutten R., Pluijm S., Klift M. van der, Jonge R. de, Lindemans J., Groot L., Hofman A., Witteman J., Leeuwen J., Breteler M., Lips P., Pols., Uitterlinden A. Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture.

- New England Journal of Medicine. 2004. Vol. 350, № 20. P. 2033–2041.
299. Amine A., Mohammadi H., Bourais I., Palleschi G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors & bioelectronics*. 2006. Vol. 21, № 8. P. 1405–23.
300. 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. № 1. P. 594.
301. Stasyuk N., Smutok O., Gayda G., Koval'chuk Y. A new bi-enzyme potentiometric sensor for arginine analysis based on recombinant human arginase I and commercial urease. *Journal of Materials Science and Engineering*. 2011. Vol. 1. P. 819–827.
302. Stasyuk N. Y., Gayda G. Z., Gonchar M. V. L-Arginine-selective microbial amperometric sensor based on recombinant yeast cells over-producing human liver arginase I. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2014. Vol. 204. P. 515–521.
303. Sheliakina M., Arkhypova V., Soldatkin O., Saiapina O., Akata B., Dzyadevych S. Urease-based ISFET biosensor for arginine determination. *Talanta*. 2014. Vol. 121. P. 18–23.
304. Verma N., Singh A., Kaur P. Biosensor based on ion selective electrode for detection of L-arginine in fruit juices. *Journal of Analytical Chemistry*. 2015. Vol. 70. № 9. P. 1111–1115.
305. Приліпко В. О., Олійник Д. М., Солдаткін О. О., Кучеренко І. С., Дзядевич С. В., Солдаткін О. П., Марченко С. В., Куйбіда М. А.; Кондуктометричний біосенсор на основі аргініндеїмінази для кількісного аналізу аргініну в рідинах біологічного походження: патент України на корисну модель № 115345; заявл.10.11.2016, опубл. 10.04.2017, Бюл. № 7. 9 с.
306. Kacaniklic V., Johansson K., Marko-Varga G., Gorton L., Jönsson-Pettersson G., Csöregi E. Amperometric biosensors for detection of L- and D-amino acids

based on coimmobilized peroxidase and L- and D-amino acid oxidases in carbon paste electrodes. *Electroanalysis*. 1994. Vol. 6. № 5–6. P. 381–390.

307. Domínguez R., Serra B., Reviejo A., Pingarrón J. Chiral analysis of amino acids using electrochemical composite bienzyme biosensors. *Analytical biochemistry*. 2001. Vol. 298. № 2. P. 275–282.

308. В. М. Пешкова. Оптимізація методики визначення сахарози в соках і солодких напоях кондуктометричним ферментним біосенсором. Біополімери і клітина. 2007. Vol. 23. № 6. P. 501 – 510.

309. Volterra A., Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nature reviews. Neuroscience*. 2005. Vol. 6. № 8. P. 626–640.

310. Capes S., Hunt D., Malmberg K., Gerstein H. Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systematic overview. *The Lancet*. 2000. Vol. 355. № 9206. P. 773–778.

311. Ishihara M., Kojima S., Sakamoto T., Asada Y., Tei C., Kimura K., Miyazaki S., Sonoda M., Tsuchihashi K., Yamagishi M., Ikeda Y., Shirai M., Hiraoka H., Inoue T., Saito F., Ogawa H., Japanese acute coronary syndrome study investigators. Acute hyperglycemia is associated with adverse outcome after acute myocardial infarction in the coronary intervention era. *American Heart Journal*. 2005. Vol. 150. № 4. P. 814–820.

312. Ishihara M., Kojima S., Sakamoto T., Kimura K., Kosuge M., Asada Y., Tei C., Miyazaki S., Sonoda M., Tsuchihashi K., Yamagishi M., Shirai M., Hiraoka H., Honda T., Ogata Y., Ogawa H. Comparison of blood glucose values on admission for acute myocardial infarction in patients with versus without diabetes mellitus. Japanese acute coronary syndrome study (JACSS) investigators. *The American Journal of Cardiology*. 2009. Vol. 104. № 6. P. 769–774.

313. Chida J., Ono R., Yamane K., Hiyoshi M., Nishimura M., Onodera M., Nakataki E., Shichijo K., Matushita M., Kido H. Blood lactate/ATP ratio, as an

alarm index and real-time biomarker in critical illness. PloS one. 2013. Vol. 8, № 4. P. 60561.

314. Cosnier S., Holzinger M. Electrosynthesized polymers for biosensing. Chemical Society Reviews. 2011. Vol. 40. № 5. P. 2146.

ДОДАТОК А

Список наукових праць за темою дисертації:

Статті:

1. Schuvailo O.M., **Soldatkin O.O.**, Lefebvre A., Cespeglio 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.
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.
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.
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.
5. **Soldatkin O.O.**, Schuvailo O.M., Marinesco S., Cespeglio 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.
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.
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.

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.
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.
10. **Солдаткін О.О.**, Щувайло О.М., Сеспуглію 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.
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*).
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.
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.
14. **Soldatkin O.O.**, Peshkova V.M., Saiapina O.Y., Kucherenko I.S., Dudchenko O.Y., Melnik V.G., Vasilenko 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.

15. Soldatkin A.P., Dzyadevych S.V., Korpan Y.I., Sergeyeva T.A., Arkhyrova V.N., Biloivan O.A., **Soldatkin O.O.**, Shkotova L.V., Zinchenko O.A., Peshkova V.M., Saiapina 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.
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.
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.
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.
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.
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.
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.

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.
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.
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.
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.
26. Кучеренко Д.Ю., Седюко 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.
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.
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.
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.

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.

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.

Патенти на корисну модель та винахід:

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.

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.

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.

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.

36. Кучеренко І.С., Кучеренко Д.Ю., **Солдаткін О.О.**, Дзядевич С.В. Солдаткін О.П., Касап Б.О., Кірмесілер 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.

Тези:

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., Архипова 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 основі трьох ферментів для інгібіторного аналізу важких металів: 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., Сеспуглію 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., Сеспуглію 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 «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (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.

ДОДАТОК Б

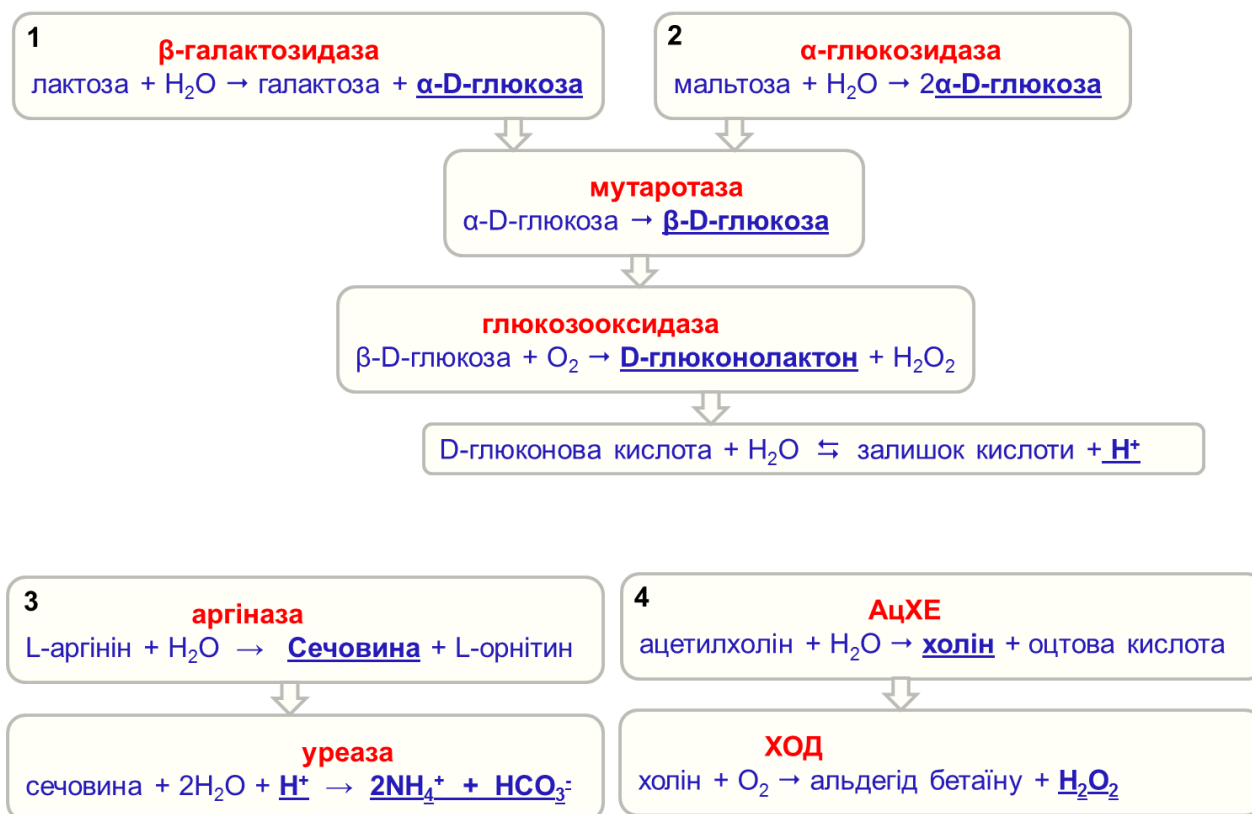


Рис. Б.1. Каскади ферментативних реакцій, що лежать в основі роботи біосенсорів для визначення лактози (1), мальтози (2), аргініну (3) та ацетилхоліну (4)

ДОДАТОК В

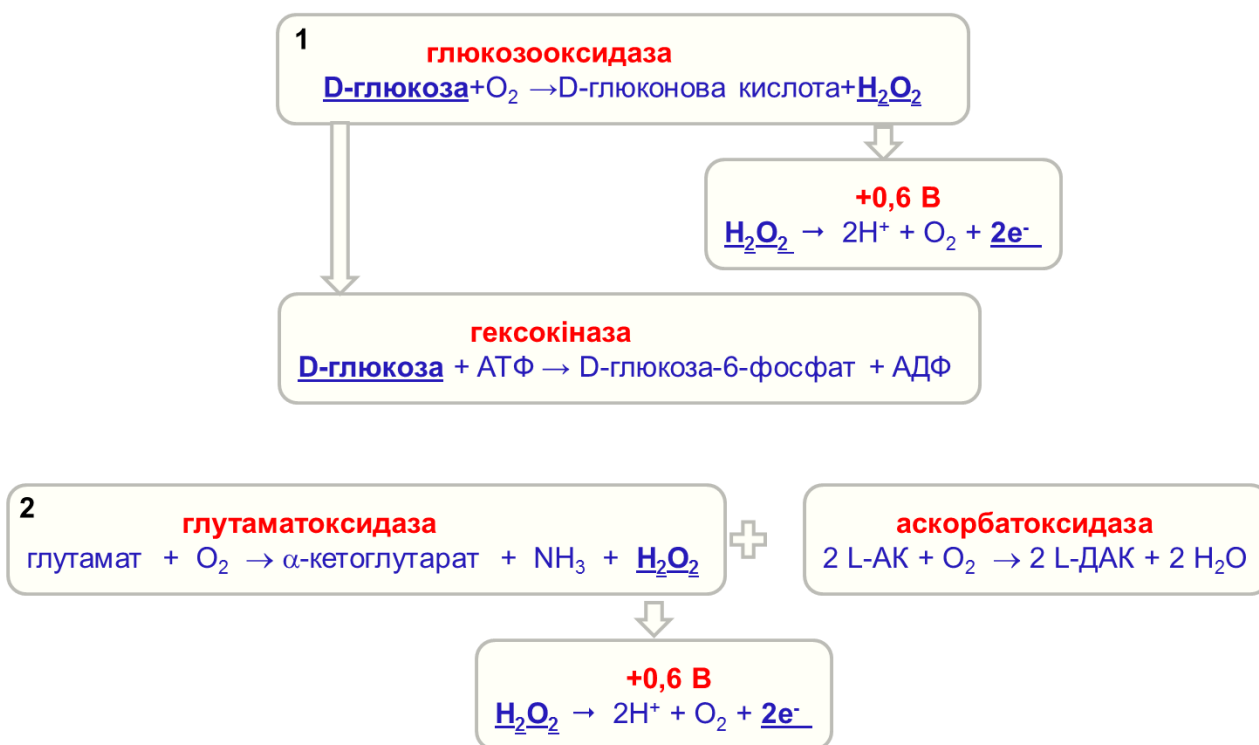


Рис. В.1. Принцип функціонування біосенсора для визначення АТФ на основі конкуренції двох ферментів за субстрат (1) та біосенсора для визначення глутамату на основі роботи незалежних двох ферментів (2)

ДОДАТОК Г

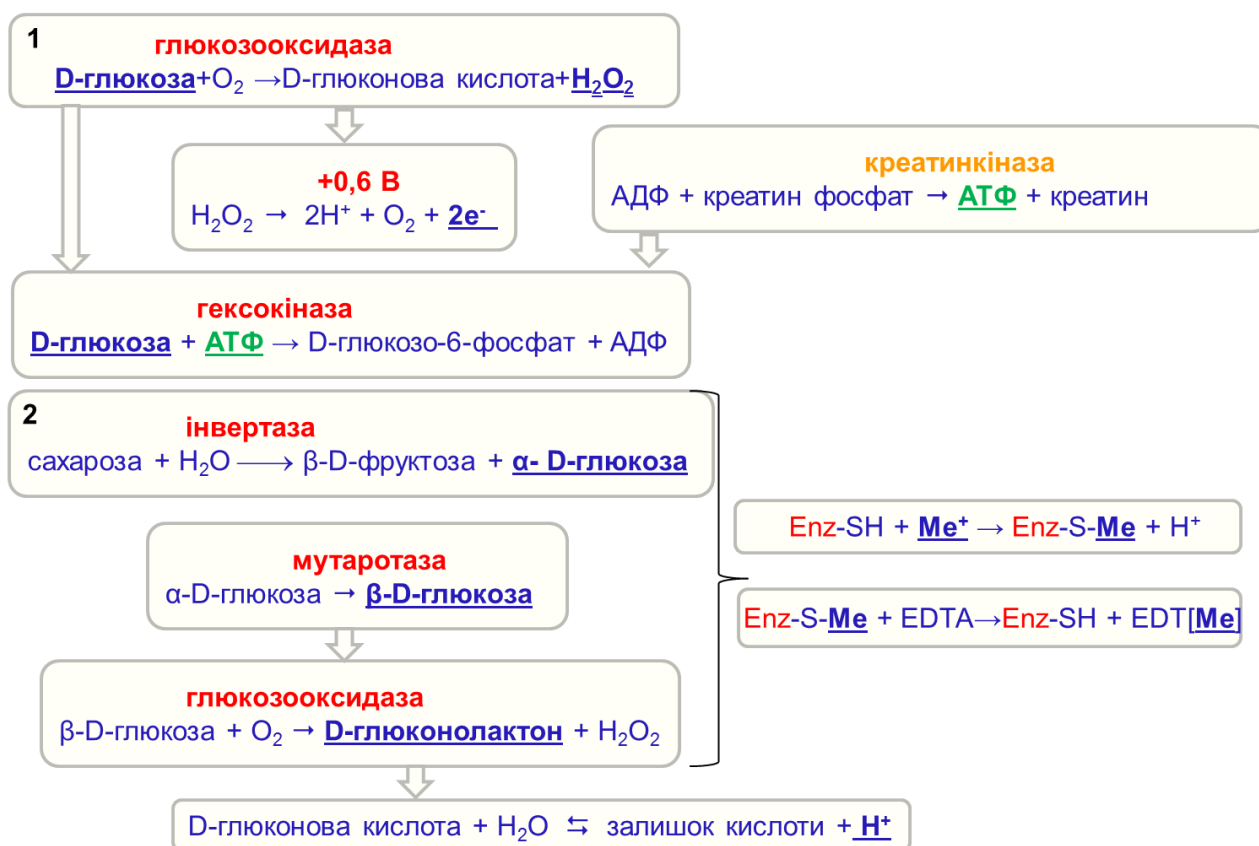


Рис. Г.1. Принцип функціонування мультиферментних біосенсорів для визначення активності ферментів (1) та непрямого визначення інгібіторів та комплексонів (2)

ДОДАТОК Д



Рис. Д.1. Копії титульних сторінок розроблених методик готування розчинів ацетилхолінхлориду та бутирилхолінхлориду (А), цукрози, глюкози, лактози та мальтози (Б), аргініну (В), АТФ (Г), реактиваторів ЕДТА та цистеїну (Д) відповідних концентрацій та креатинкінази відповідної активності (Е), затверджених в ДП «Укрметртестстандарт».

ДОДАТОК Е



Рис. Е.1. Копії титульних сторінок розроблених методик градування лабораторних прототипів мультиферментних біосенсорів для визначення мальтози (А), сахарози (Б), лактози (В) та АТФ (Г), затверджених в ДП «Укрметртестстандарт».