

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ І ВІРУСОЛОГІЇ ІМ. Д. К. ЗАБОЛОТНОГО
НАН УКРАЇНИ**



АРХИПОВА Валентина Миколаївна

УДК 543.555+577.15+543.553

**ФУНДАМЕНТАЛЬНІ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ОСНОВИ
ЗАСТОСУВАННЯ ХОЛІНЕСТЕРАЗ В БІОСЕНСОРАХ**

03.00.20 – Біотехнологія
091 – Біологія та біохімія

РЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Київ – 2025

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано у відділі біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ).

Науковий консультант: доктор біологічних наук, професор,
академік НАН України

Солдаткін Олексій Петрович

Офіційні опоненти:

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

доктор біологічних наук, професор,
член-кореспондент НАН України
Гончар Михайло Васильович,
Інститут біології клітини НАН України,
завідувач відділу аналітичної біотехнології

доктор біологічних наук,
старший науковий співробітник
Поєдинок Наталія Леонідівна,
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря
Сікорського», доцент кафедри трансляційної
медичної біоінженерії

Захист відбудеться «01» жовтня 2025 р. о 11⁰⁰ год. на засіданні докторської ради Д 26.233.01 Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України за адресою: 03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 154.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України (03143, Київ-143, вул. Академіка Заболотного, 154) та на офіційному веб-сайті Інституту за посиланням:
<https://imv.org.ua/struktura/council/informaciia-pro-robotu/>.

Вчений секретар
докторської ради,
кандидат біологічних наук, с.н.с.



Наталія ЛЕОНОВА

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. На сьогодні біосенсорні технології, які є частиною аналітичних біотехнологій, відносяться до ключових світових експоненціальних технологій, параметри яких покращуються на десятки чи навіть сотні процентів на рік, при тому ж рівні базової вартості. А якщо при цьому вони дозволяють спільне використання з іншими технологіями, наприклад нанотехнологіями, то відбувається запрограмований технологічний вибух. Наприклад, ринок різноманітних сенсорів за 10 років починаючи з 2007 р. виріс в тисячу разів, а їхня вартість зменшилась в тисячу разів, беручи до уваги функціональні можливості таких систем (Sezgintürk, 2020). Це найкращим чином демонструє успіхи в розвитку цієї галузі.

Електрохімічні біосенсори розглядаються сьогодні як успішна альтернатива традиційним аналітичним методам з огляду на існуючі в світі успіхи в створенні їхніх лабораторних прототипів та наявності на ринку низки нового вимірювального обладнання, що робить їх конкурентоспроможними. Інтерес до біосенсорів обумовлено, перш за все, рядом їхніх певних переваг перед традиційними аналітичними методами. Застосовуючи біосенсори відпадає необхідність у використанні громіздких та дорогих приладів. Аналіз з використанням біосенсорів є більш простим і не потребує спеціальних навичок, тому орієнтований на звичайного користувача. Таким чином, біосенсорний аналіз загалом є дешевшим та зручнішим. Як інструменти скринінгу, біосенсори можуть допомогти попередньо відібрати певне число сумнівних зразків, які надалі будуть додатково проаналізовані за допомогою традиційних методів, знижуючи таким чином загальну вартість і час аналізу.

Холінестераза – це один із багатьох ензимів, що відповідають за функціонування нервової системи як тварин та комах, так і людей. У випадках, коли кількість цього ензиму знижується до критичного рівня, нервові імпульси, що йдуть до м'язів, не можуть контролюватися протягом довгого часу. Це може призвести до серйозних наслідків, в тому числі смерті (Massoulié et al., 1993). Деякі класи хімічних токсинів, такі як глікоалкалоїди, карбаматні та органофосфорні пестициди, деякі іони важких металів, проявляють себе як інгібітори холінестераз. Попадаючи в організм, вони зменшують кількість активних молекул холінестераз, що необхідна для нормального функціонування організму.

Біосенсори на основі холінестераз знайшли своє застосування саме завдяки можливості їхнього використання для визначення слідових кількостей деяких токсичних сполук, які є інгібіторами холінестераз (Singh et al., 1999; Jaffrezic-Renault et al., 1996). Розроблено ряд різних біосенсорів на основі холінестераз з використанням різних джерел ферментів, методів іммобілізації та схем детекції, серед яких можна виділити електрохімічні (Dzyadevych et al., 1994; Ivanov et al., 2000), оптичні (Xavier et al., 2000; Pogačnik et al., 2003) та п'єзоелектричні (Makower et al., 2003). Але більшість із цих досліджень є дещо фрагментарними і стосуються, в основному, тільки визначення органофосфорних пестицидів. В них відсутній ґрунтовний аналіз можливостей застосування різних систем

перетворення сигналу, а також специфічних особливостей перетворювачів, використання холінестераз з різних джерел та методів їхньої іммобілізації, оцінки типу інгібування і реактивації холінестераз та застосування цих підходів до створення процедур визначення токсинів. Тому основні переваги застосування холінестераз як селективних елементів біосенсорів не завжди використовуються з максимальною ефективністю, що робить це дослідження актуальним для аналітичної біотехнології.

До того ж, зовсім невелика кількість робіт доведена до стадії застосування розроблених біосенсорів на основі холінестераз для роботи з реальними зразками. Досить часто розроблені лабораторні прототипи біосенсорів добре працюють у модельних розчинах, однак при переході до аналізу реальних зразків виникають труднощі, які ускладнюють, а іноді й унеможливають роботу створених систем (Dzyadevych, Soldatkin, 2008). Це підтверджується відсутністю комерційних біосенсорних систем для застосування в сільському господарстві та екології. Також повністю відсутні експериментальні роботи по розробці біосенсорів на основі холінестераз для оцінки якості мікробних препаратів, що використовуються для очистки навколишнього середовища від забруднення пестицидами.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконувалась у відділі біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та відповідає основному плану робіт бюджетних тем № 2.2.4.22 “Електрохімічні мультибіосенсиори та сенсорні масиви: фундаментальні основи створення та функціонування” (№ держ. реєстрації 0107U003346, 2008 – 2012 рр.) та «Нові електрохімічні та оптичні біосенсиори на основі функціональних наноструктурованих матеріалів» (№ держ. реєстрації 0117U002879, 2018 – 2022 рр.), а також проектів «Мультибіосенсор для визначення загальної токсичності розчинів та окремих токсичних речовин» комплексної науково-технічної програми НАН України «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб» (№ держ. реєстрації 0107U003133, 2007 – 2009 рр.), «Розробка та дослідна експлуатація портативного приладу на основі ферментних потенціометричних біосенсорів для аналізу алкалоїдів та інших природних токсинів в сільськогосподарських культурах і продуктах» комплексної науково-технічної програми НАН України «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» (№ держ. реєстрації 0113U002504, 2013 – 2017 рр.), «Розробка та оптимізація портативного приладу на основі ферментних електрохімічних біосенсорів для аналізу мікотоксинів в сільськогосподарських культурах і продуктах» цільової програми наукових досліджень НАН України «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (№ держ. реєстрації 0118U005165, 2018 – 2022 рр.), «Дослідження особливостей формування сучасних біоселективних елементів на основі наноматеріалів різної природи для електрохімічних біосенсорів та сенсорних масивів із заданими та керованими властивостями» грантової підтримки Національного фонду досліджень України у межах конкурсу «Підтримка досліджень провідних та молодих учених» (№ держ. реєстрації 0120U104529, 2020

– 2023). Частину роботи виконано в рамках міжнародних проектів FP7-PEOPLE-IRSES-2008 проекту «Nanosensors based on nanomaterials» № 230802 (2009 – 2011), STCU Project No 4591 «Development of enzyme multisensor arrays for ecological monitoring of toxins» (2010 – 2012), FP7-PEOPLE-IRSES-2012 проекту «Integrated nanomaterials and nanodevices» № 318524 (2013 – 2015), Horizon-2020 WIDESPREAD-05-2020 проекту “Deeping collaboration on novel biomolecular electronics based on “smart” nanomaterials” No 951887 (2020 – 2024).

Мета і завдання. Метою дисертаційної роботи є розробка фундаментальних та біотехнологічних основ застосування холінестераз в електрохімічних біосенсорах для практичного застосування в сільському господарстві та екологічному моніторингу.

Для досягнення вказаної мети було поставлено ряд завдань:

1. Розробити дизайн та оптимізувати електрохімічні перетворювачі та експериментальні вимірювальні системи для подальшої роботи з холінестеразами як селективними елементами біосенсорів.
2. Розробити, дослідити та оптимізувати методи іммобілізації холінестераз на поверхнях електрохімічних перетворювачів.
3. Дослідити можливість використання іммобілізованих холінестераз в складі електрохімічних біосенсорів з використанням інгібіторного аналізу та проаналізувати особливості їхнього функціонування.
4. Розробити електрохімічні біосенсиори на основі ацетил- та бутирилхолінестераз для інгібіторного визначення різноманітних токсичних речовин, створити їх лабораторні прототипи та запропонувати технологічні схеми та методики виготовлення таких пристроїв.
5. Провести апробацію розроблених біосенсорів на основі холінестераз в аналізі реальних зразків та виконати верифікацію отриманих результатів традиційними методами.

Об'єкт дослідження: ензиматичні реакції за участі холінестераз, іммобілізованих на поверхнях електрохімічних перетворювачів.

Предмет дослідження: кондуктометричні перетворювачі, рН-чутливі польові транзистори, схеми електрохімічного аналізу, електрохімічні біосенсиори на основі холінестераз.

Методи дослідження: методи іммобілізації ферменту; визначення активності ферментів; електрохімічні методи досліджень (кондуктометричний, потенціометричний); високоефективна рідинна хроматографія; електронна мікроскопія; статистичні методи аналізу.

Наукова новизна отриманих результатів. В роботі вперше проаналізовано, систематизовано та розроблено низку біосенсорів на основі холінестераз з використанням різних типів електрохімічних перетворювачів, процедури іммобілізації ензимів та методик вимірювань, враховуючи прикладні аспекти їхнього застосування в сільському господарстві та екології.

Детально досліджено та визначено біохімічні параметри іммобілізованих на поверхні перетворювачів холінестераз (K_M , V_{max} , K_i , $i_{0,5}$) та вперше ідентифіковано типи інгібування в залежності від природи токсинів, що дозволяє моделювати

взаємодію ензимів з інгібіторами на молекулярному рівні та дає змогу адаптувати характеристики біосенсорів під конкретні прикладні потреби завдяки суттєвій різниці в інгібуванні ацетил- та бутирилхолінестерази різними токсичними речовинами.

Вперше розроблено математичну модель роботи потенціометричного біосенсора на основі бутирилхолінестерази для інгібіторного визначення α -чаконіну, яка повністю описує біохімічні реакції, що відбуваються в ензимній мембрані біосенсора за участі субстратів та інгібіторів.

Вперше розроблено низку нових ензимних біосенсорів для визначення поверхнево-активних речовин у водних розчинах на основі кондуктометричного (Патент України № 52437) та потенціометричного (Патент України № 55939) методів аналізу, досліджено їхні аналітичні характеристики та продемонстровано особливості функціонування.

Вперше розроблено ензимний потенціометричний біосенсор для експрес-аналізу афлатоксинів у пробах зернових (Патент України № 100062) та сумарного вмісту індольних алкалоїдів (Патент України № 118762) в зразках культури тканин раувольфії зміїної.

Вперше продемонстровано можливість використання холінестераз в складі мультибіосенсора для визначення концентрацій токсичних речовин у водних розчинах (Патент України № 27284).

Запропоновано нову методику одночасного виявлення різних класів токсичних речовин за допомогою потенціометричного біосенсора на основі ацетилхолінестерази та проведено її апробацію при одночасному визначенні трихлорфону та афлатоксину.

Створені лабораторні прототипи розроблених біосенсорів на основі холінестераз вперше успішно апробовано при інгібіторному аналізі реальних зразків (сік картоплі та томатів, екстракти зернових та бобових культур, водні зразки доквілля тощо) та показано високу кореляцію отриманих результатів з даними традиційних методів аналізу.

Теоретичне та практичне значення отриманих результатів. Розроблено фундаментальні та біотехнологічні основи застосування холінестераз в електрохімічних біосенсорах для практичного застосування в сільському господарстві та екологічному моніторингу, які полягають в створенні загальної концепції мультифункціонального застосування холінестераз в біосенсорах, методики селективного аналізу токсинів різної природи завдяки використанню різних підходів до інгібування та реактивації холінестераз та детальної покрокової процедури розробки електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз.

Розроблено дизайн кондуктометричних перетворювачів, рН-чутливих польових транзисторів (потенціометричні перетворювачі), електрохімічних комірок, оптимізовано електрохімічні вимірювальні системи та схеми, що дозволяє їхнє подальше застосування не тільки з холінестеразами як селективними елементами біосенсорів, але і з іншими ензимами.

Розроблені електрохімічні біосенсиори на основі іммобілізованих холінестераз та запропоновані їхні лабораторні прототипи в подальшому можуть

бути використані для експрес-аналізу вмісту низки токсичних речовин в реальних зразках довкілля. Для частини отриманих біосенсорів виконано ряд метрологічних досліджень, стандартизовані методики визначення токсинів затверджено в ДП «Укрметртестстандарт».

Розроблені біосенсори для визначення глікоалкалоїдів можуть успішно застосовуватись в різних сферах людської діяльності для контролю вмісту алкалоїдів у посівних лініях та потенційних комерційних сортах. Це дозволить уникнути перевищення небезпечних для споживання концентрацій алкалоїдів, вибирати відповідні умови вирощування та процедур транспортування та зберігання врожаю та проводити селекцію сортів картоплі, що володіють інсектицидною, антимікробною та фунгітоксичною активністю.

Електрохімічний ензимний біосенсор для аналізу загального вмісту афлатоксинів у пробах зернових культур може бути застосований для контролю якості харчових продуктів за рахунок експрес моніторингу наявності токсинів.

Запропонований новий підхід для одночасного селективного вимірювання декількох токсинів різних класів за допомогою біосенсора на основі ацетилхолінестерази дозволяє аналізувати складні мультикомпонентні зразки, в складі яких є як афлатоксини, так і пестициди.

Створені лабораторні прототипи електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз можуть бути основою комерційних пристроїв для експресного аналізу токсичних речовин різної природи, що можуть вироблятися як в Україні, так і за кордоном.

Матеріали дисертації використовуються в навчальному процесі в Навчально-науковому інституті високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

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 дисертанткою особисто, або за її безпосереднього керівництва та участі в проведенні експериментів. Основні напрямки дослідження, мету роботи, положення та висновки сформульовано разом із науковим консультантом – академіком НАН України, д.б.н., проф. О.П. Солдаткіним. Основні результати експериментальних досліджень із розробки електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз для практичного застосування в сільському господарстві та екологічному моніторингу отримано автором особисто. Частина експериментальних робіт із оптимізації біосенсорів та їхньої апробації при роботі з реальними зразками проведено у тісному співробітництві з д.б.н., пров.н.с. Солдаткіним О.О., PhD Степурською К.В., PhD Беніловою І.В., к.б.н., н.с. Кучеренко І.С., professor Jaffrezic-Renault N. (CNRS Lyon, France), professor Martelet C. (Ecole Centrale de Lyon, France), professor Chovelon J.-M. (Claude Bernard University Lyon 1, France), professor Akata B. (METU Ankara, Turkey), студентами Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка Коробко М.Ю. та Шелякіною М.К. та студентами Середньо-Східного Технічного Університету м. Анкара (Туреччина) E. Soy, S.K. Kirdeciler, B. Ozansoy

Kasar, результати досліджень опубліковано в спільних публікаціях. Обговорення та аналіз результатів досліджень проведено із науковим консультантом – академіком НАН України, д.б.н., проф. Солдаткіним О.П., академіком НАН України, д.б.н., проф. Дзядевичем С.В., академіком НАН України, д.б.н., проф. Єльською Г.В., яким здобувач висловлює вдячність за надану допомогу та велику увагу до дисертаційної роботи. Також дисертант щиро вдячна співробітникам Інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України д.ф.-м.н., с.н.с. Куклі О.Л. та н.с. Павлюченко О.С. за допомогу в розробці вимірювальних систем та корисні поради стосовно електрохімічних методів вимірювання, співробітникам Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України к.б.н., с.н.с. Циганенко К.С. та к.б.н., с.н.с. Савчуку Я.І. за підготовку інфікованих зразків та участь у проведенні вимірювань традиційними методами аналізу, співробітникам Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського д.т.н., проф. Марценюку В.П. та д.т.н., проф. Сверстюку А.С. за допомогу в математичному моделюванні.

Апробація матеріалів дисертації. Результати досліджень було представлено на наступних фахових конференціях: 1st Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (Odesa, Ukraine, 2001), Міжнародна конференція «MADICA» (Tunisie 2001, 2004), Eurosensors XVI (Prague, Czech Republic, 2002), 16th European Conference on Solid-State Transducers (Prague, Czech Republic, 2002), International Conference “Functionalized materials: synthesis, properties and application” (Kyiv, Ukraine, 2002), 3rd Aegean Analytical Chemistry Days (Polihnitos, Lesvos, Greece, 2002), 17th European Conference on Solid-State Transducers (Guimaraes, Portugal, 2003), 3rd International Conference of Instrumental Methods of Analysis (Thessaloniki, Greece, 2003), International Workshop on Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring (Marrakech, Morocco, 2003), Міжнародна науково-технічна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, Україна, 2004, 2006, 2010, 2014), World Congress "Biosensors" (Granada, Spain, 2004), VIIIth International Meeting on Cholinesterases (Perugia, Italy, 2004), Second International Symposium on Intelligent Artifacts and Bio-systems (Lyon, France, 2005), 16th Triennial Conference of the European Association for potato research (Bilbao, Spain, 2005), Ukrainian-German Symposium on Nanobiotechnology (Kyiv, Ukraine, 2006), International Conference “Functional Materials” ICFM (Партеніт, 2007, 2011), III міжнародна наукова конференція “Фізичні методи в екології, біології та медицині” (Львів-Шацьк, Україна, 2010), Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих учених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, Україна, 2011), Thirty-fourth AMOP technical seminar on environmental contamination and response (Alberta, Canada, 2011), III Всеукраїнська науково-практична конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, Україна, 2014), International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials” (Yaremche-Lviv, Ukraine, 2014), EMRS 2015 Spring Meeting (Lille, France, 2015), Journee de Printemps de la SCF en Rhone Alpes (Villeurbanne, France, 2015), International Porous and Powder Materials Symposium and Exhibition (Cesme Izmir,

Turkey, 2015), V^{ème} Journée Rhône-Alpes des Biomolécules (Villeurbanne, France, 2016), XII Український біохімічний конгрес (Тернопіль, Україна, 2019), Scientific Meeting «Deeping collaboration on novel biomolecular electronics based on “smart” nanomaterials» (Lyon, France, 2020), International Conference «Information-Communication Technologies & Embedded Systems» (Mykolaiv, Ukraine, 2020), International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2021) (Львів, Україна, 2021), Deuxièmes Rencontres Capteurs de l’Université Bourgogne Franche-Comté (Dijon, France, 2022), IX з’їзд Українського біофізичного товариства (Київ, Україна, 2023).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 47 наукових статтях у фахових наукових журналах (із них 30 із бази даних Scopus, в.т.ч. 25 статей у виданнях, віднесених до кватилів Q1 – Q3 відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank), 4 монографіях та розділах монографій, 1 методичному посібнику, 30 тезах доповідей на наукових конференціях, отримано 7 патентів України.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотацій (українською та англійською мовами), вступу, 6 розділів (огляд літератури, матеріали та методи досліджень, експериментальні результати та їх обговорення, аналіз і узагальнення), висновків, списку використаних джерел (267 найменувань) та додатків А-Г. Дисертація викладена на 357 сторінках тексту, проілюстрована 169 рисунками і 13 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень.

В роботі було використано наступні препарати та реактиви: ензими ацетилхолінестераза (АцХЕ) із електричного вугря (КФ 3.1.1.7) з активностями 200-1000 од. акт./мг ензиму та бутирихолінестераза (БуХЕ) (КФ 3.1.1.8) із сироватки крові коня з активностями 10-20 од. акт./мг ензиму та із сироватки крові людини з активністю 6,4 од. акт./мг препарату виробництва фірми Sigma-Aldrich, а також субстрати ацетилхолін хлорид (АцХХ) та бутирилхолін хлорид (БуХХ) фірми Sigma-Aldrich.

Для іммобілізації мембран застосовували 25% и 50% водний розчин глутарового альдегіду (ГА) фірми Serva (Німеччина) та фотополімер полі(вініл)алкоголь, що містить стирилпіридин (PVA/SbQ) фірми Toyo Gosei Kogyo Co.Ltd, Японія; сироватковий альбумін бика (БСА) та гліцерин фірми Serva (Німеччина).

Як робочі буферні розчини використовували KH_2PO_4 -NaOH фірми Merck, (Німеччина) різної буферної ємності та рН, багатоконпонентний буфер “Полімікс”, який готували за таким складом: 2,5 мМ Трис, 2,5 мМ KH_2PO_4 , 2,5 мМ лимонної кислоти, 2,5 мМ тетраборат натрію, 150 мМ NaCl. РН цього буфера регулювали титруванням або NaOH, або HCl.

Для інгібіторного аналізу як модельні і калібрувальні розчини використовували фосфорорганічні пестициди трихлорфон [(dimethyl – 2,2,2-

trichlor – 1 – hydroxyethyl) - phosphonat], діізопропилфторфосфат (diisopropyl fluorophosphate), параоксон-етил (O,O-diethyl O-(4-nitrophenyl) phosphate), параоксон-метил (O,O-dimethyl O-(4-nitrophenyl) phosphate), паратіон-метил (O,O-dimethyl O-(4-nitrophenyl) thiophosphate) фірми Riedel-de-Haen (Швейцарія); карбаматний пестицид карбофуран [2,3 – dihydro - 2,2 – dimethylbenzofuran–7-yl N-methylcarbamate] фірми Riedel-de-Haen (Швейцарія); глікоалкалоїди та аглікони α -соланін (95 % чистоти) та α -чаконін (95 % чистоти) з пагонів *Solanum tuberosum*, томатин (Lycopersicin) (98 % чистоти), демісідін (соланін D), езерін (Physostigmine) та аглікони соланідін (98 % чистоти) з паростків картоплі, томатидін (3 β -Hydroxy-5 α -tomatidane), соласодін (Solasod-5-en-3 β -ol) (99 % чистоти) фірми Sigma-Aldrich; мікотоксини афлатоксин B1 (чистота 98%), афлатоксин G1 (чистота 98%) виробництва фірми Sigma-Aldrich; іони важких металів Cu(NO₃)₂ вітчизняного виробництва; поверхнево-активні речовини бензалконіум хлорид (C₆H₅CH₂N(CH₃)₂RCI, (R=C₈H₁₇ до C₁₈H₃₇)) - катіонна поверхнево-активна речовина фірми Fluka (Швеція) та додецилсульфат натрію (C₁₂H₂₅O₄NaS) - аніонна поверхнево-активна речовина, отримана з 3 різних заводів України. Як реактиватори використовували розчин піридин-2-альдоксимметилйодиду (ПАМ-2) та етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА) фірми Sigma-Aldrich.

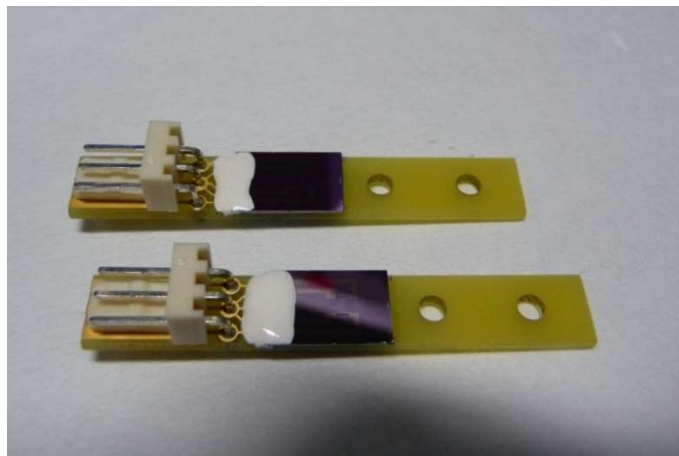
Як розчинники були використані метанол (CH₃OH, чистота 99,9%), ацетонітрил (CH₃CN, чистота 99,8%), диметилсульфоксид (ДМСО) ((CH₃)₂SO), чистота $\geq 99.8\%$), етанол (C₂H₅OH, чистота $\geq 99.8\%$), виробництва фірми Sigma-Aldrich, етилацетат (CH₃COOC₂H₅), бутанол (C₄H₉OH), ксилол (C₆H₄(CH₃)₂), ізоаміловий спирт ((CH₃)₂CHCH₂CH₂OH), ізопропіловий спирт або ізопропанол (CH₃CH(OH)CH₃) вітчизняного виробництва.

В роботі використовували золоті 10 нм наночастинки (стабілізована суспензія в цитратному буфері) фірми Sigma-Aldrich та колоїдні наночастинки золота розміром 20 нм та 30 нм, що синтезували за методом Туркевич-Френса (Frens, 1973; Turkevich et al., 1951) у власній модифікації шляхом відновлення золотохлористоводневої кислоти ($\geq 99.9\%$ чистоти, Sigma-Aldrich) цитратом натрію у присутності карбонату калію. Також в роботі використовували цеоліти різних типів, які були синтезовані в Центральній-східному технічному університеті (Анкара, Туреччина).

Для визначення рН-чутливості перетворювачів використовували стандартні рН-титри від "Singles" (США) та рН-титри вітчизняного виробництва. Інші неорганічні сполуки, що використовувалися в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти „х.ч.“ та „ч.д.а.“.

В роботі використовувались рН-чутливі польові транзистори (рН-ПТ), виготовлені за стандартною кремнієвою технологією в Науково-дослідницькому Інституті "Мікроприлад" (Київ, Україна) (Dzyadevych et al., 1999), та рН-ПТ, які були розроблені та виготовлені в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України за нашої безпосередньої участі. Технологія виготовлення транзисторів декілька разів модифікувалась і, відповідно, змінювались їхні характеристики. Для кожної серії перетворювачів проводили комплекс досліджень основних параметрів датчиків та вносились зміни в

технологічний цикл їхнього виробництва. В результаті цих робіт ми отримали рН-ПТ з характеристиками, що дозволили їх використання для створення біосенсорів (рис.1А). Для роботи з такими датчиками було розроблено та виготовлено декілька варіантів портативних приладів. Було введено етапи безпеки, тестування та внутрішнього калібрування як самих приладів, так і перетворювачів. Також було розроблено та виготовлено вимірювальні кювети та комірки різних модифікацій, механічні вузли до них, різні електроди порівняння, електронний еквівалент для тестування та контролю роботи приладу (рис.1Б)



(А)



(Б)

Рис. 1. Загальний вигляд рН-чутливих польових транзисторів (А) та портативної системи для проведення вимірювань (Б), виготовлених в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України.

В роботі використовувались перетворювачі, виготовлені згідно наших рекомендацій і пропозицій в Інституті хемо- та біосенсорики (м.Мюнстер, Німеччина) (Dzyadevych et al., 2005) та Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України (м. Київ, Україна) (Архипова та інші, 2005) за нашої безпосередньої участі (рис. 2А). Процеси, що відбуваються в мембрані та на поверхні кондуктометричних перетворювачів моделюються еквівалентними електронними ланцюгами. Досліджено та отримано залежності для різних модифікацій датчиків по чутливості, стабільності, тощо. В результаті цих робіт ми обрали кондуктометричні гребінчасті електроди з характеристиками, що дозволили їх використання для створення біосенсорів. Для роботи з кондуктометричними біосенсорами разом з Інститутом електродинаміки НАН України були розроблені та виготовлені портативні прилади та різноманітні супутні компоненти.

Для створення біоселективних елементів за основу був взятий метод іммобілізації ферментів за допомогою глутарового альдегіду (Dzyadevych et al., 2001). Біоселективні мембрани отримували шляхом коіммобілізації ензиму у суміші з БСА у парах чи краплі ГА на поверхні перетворювачів.

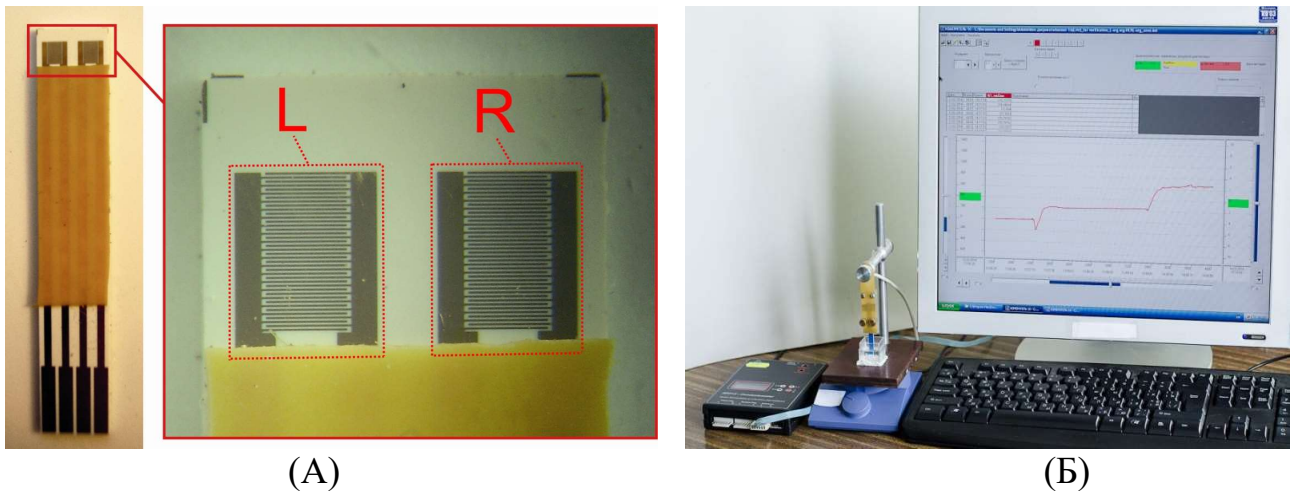


Рис. 2. Загальний вигляд кондуктометричного перетворювача виробництва Інституту фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова (L – ліва пара електродів, R – права пара електродів) (А) та портативної системи для проведення вимірювань (Б), виготовлених в Інституті електродинаміки НАН України (Б).

Всі вимірювання проводили при денному світлі за кімнатної температури у відкритій комірці об'ємом 1 мл – 5 мл при постійному перемішуванні, в робочому буфері (фосфатний, Polymix), з рН 5,5 – 9,0 в залежності від задач експерименту. Всі дослідження з використанням різних методик проводилися щонайменше із 3-кратним повторенням. Завдяки використанню диференційного режиму вимірювань, неспецифічних змін вихідного сигналу, пов'язаних з коливанням температури, рН середовища, електричними наводками не було.

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

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розробка, дослідження та оптимізація методів іммобілізації холінестераз на поверхню електрохімічних перетворювачів. Порівняння різних методів іммобілізації ферментів показало, що для холінестераз оптимальним є такий метод іммобілізації як ковалентне зшивання ензиму в насичених парах глутарового альдегіду. Однак залишалось питання недостатньої відтворюваності самого процесу іммобілізації ензимів. Тому необхідно було дослідити властивості іммобілізованих холінестераз, вплив модифікації поверхні перетворювачів на процес іммобілізації, можливості застосування наночастинок при іммобілізації для покращення їхніх властивостей, дослідити біохімічні параметри іммобілізованих холінестераз ідентифікувати типи інгібування та розробити математичну модель біосенсора на основі холінестераз.

Показано, що оптимальним для іммобілізації АцХЕ був вміст ензиму в робочій мембрані 1%, а для БуХЕ – вміст ензиму 5%. Найкращий час іммобілізації ензиму – 30 хвилин, тому що, з одного боку, цього часу достатньо для того, щоб

мембрана досить добре трималася на поверхні перетворювача, а з іншого - сенсор показує відносно високі відгуки. Також було показано, що іммобілізовані АцХЕ та БуХЕ демонструють непогану відтворюваність та стабільність відгуків біосенсора. Терміни і якість роботи біосенсора в досить великій мірі залежать від якості іммобілізації біоселективного елемента. Іноді відбувається швидка деградація біосенсора, коли на тлі невеликого корисного сигналу сторонні шуми швидко збільшуються і нівелюють його. Найімовірніше цей ефект пов'язаний з процесами поганої адгезії мембран до поверхні перетворювачів. Тому необхідно було модифікувати поверхню для покращення процесу іммобілізації холінестераз на поверхню перетворювачів.

Спочатку були проведені попередні дослідження з визначення оптимальних умов сіланізації, зокрема підбиралися розчинники, обсяги та концентрації реагенту для сіланізації поверхні перетворювача. Було детально досліджено вплив такої модифікації поверхні на характеристики як самих перетворювачів, так і біосенсорів в цілому. Ряд перетворювачів показали величини відгуків в 3-5 разів більше (на 7-12 мкА), ніж до сіланізації. Сенсори також продемонстрували дуже хорошу відтворюваність відгуків як протягом дня, так і при зберіганні (протягом 5 днів в буферному розчині при кімнатній температурі). Подальша іммобілізація холінестераз на поверхню модифікованих перетворювачів не продемонструвала особливих переваг сіланізації поверхні у порівнянні з немодифікованими перетворювачами. Відбувається набагато міцніша пришивка біологічного матеріалу до модифікованої поверхні ІСПТ, але поки що важко сказати, наскільки це ефективно.

Наступним етапом роботи було дослідження модифікації перетворювачів та мембран за допомогою використання цеолітів та наночастинок золота. Наночастинки забезпечують ідеальний компроміс, коли йдеться про зазвичай суперечливі вимоги, що виникають при оптимізації іммобілізованих ензимів, тобто обмеження мінімальної дифузії, максимальна поверхня на одиницю маси і висока ефективність навантаження ензимом.

Було проведено комплекс експериментів для можливості поліпшення роботи біоселективних елементів на основі ферменту БуХЕ та різних цеолітів. Відгуки біосенсорів на основі БуХЕ досліджували та порівнювали при модифікації перетворювачів частинками цеоліту ВЕА, що були термічно обробленими (ВЕА-1, ВЕА-2 та ВЕА-3). Отримані калібрувальні криві біосенсорів на основі іммобілізованої БуХЕ з різними частинками цеоліту ВЕА показані на рис. 3.

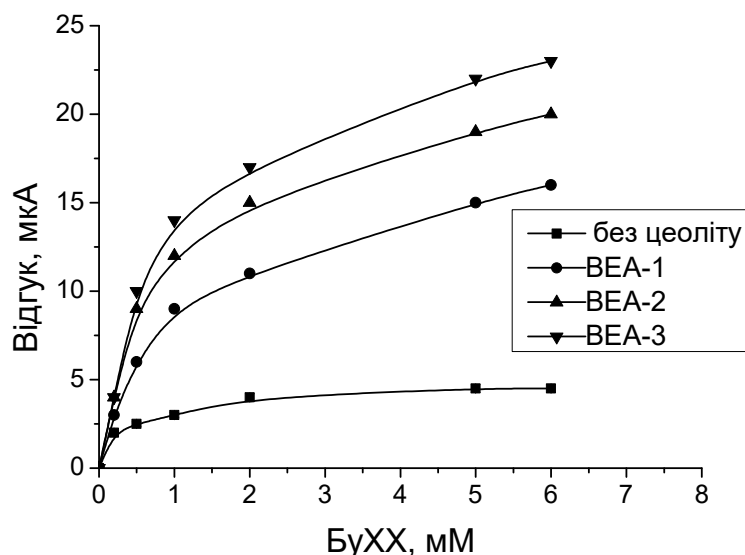


Рис. 3. Калібрувальні криві біосенсорів на основі іммобілізованої БуХЕ з та без термооброблених зразків ВЕА. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4.

Додавання цеоліту в ензимні мембрани збільшувало відгуки біосенсорів приблизно в 3 рази. Ці результати вперше продемонстрували, що можна адаптувати поверхні перетворювачів цеолітами для отримання збільшення відгуків. Біосенсиори також продемонстрували високу відтворюваність та стабільність сигналів.

Наступним етапом нашої роботи було дослідження впливу модифікації біоселективного елемента шляхом використання наночастинок золота на роботу ензимного сенсора на основі холінестераз. Наночастинки золота можуть широко використовуватись в біосенсорах на основі ензимів. Вони є високопровідними та біосумісними, можуть утворювати міцні тілові зв'язки між органічними речовинами (наприклад, залишками цистеїну ензимів), таким чином утворюючи відповідне мікросередовище для іммобілізації ензимів.

Було отримано, що використання у складі біоселективного елемента наночастинок золота призводить до помітної зміни результатів. Якщо при звичайній іммобілізації, тестові відгуки сенсорів на 1 мМ БуХХ не перевищували 8 мкА, то при додаванні в робочу ферментну мембрану наночастинок золота тестові відгуки зростали до 18-27 мкА. При додаванні колоїдного розчину золота в обидві мембрани, спостерігалось ще більш певне збільшення відгуків.

Наступним експериментом був підбір оптимального співвідношення колоїдного розчину наночастинок золота (концентрація 38,6 мкг/мл) з ензимною сумішшю (5% АцХЕ) під час іммобілізації. Перевірялась залежність відгуків біосенсорів від співвідношення АцХЕ та наночастинок золота, а саме відгуки біосенсора в стані ензиматичного насичення субстратом (2 мМ ацетилхолін) (рис. 4). Як видно з рисунка, оптимальне співвідношення розчинів ензима і наночастинок золота – 3:1.

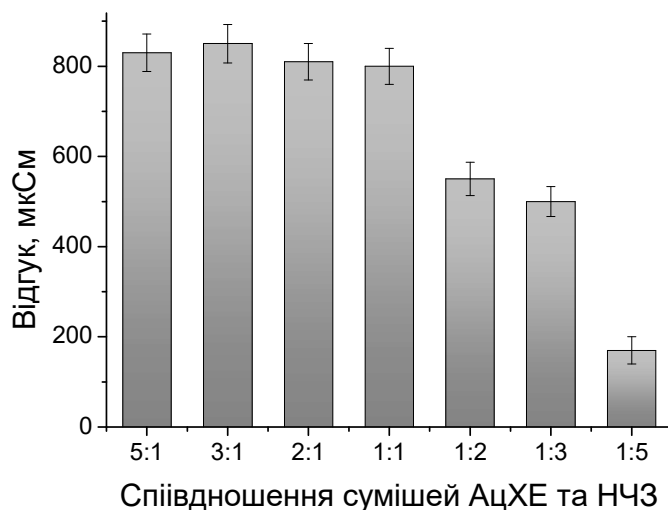


Рис. 4. Відгуки АцХЕ-біосенсорів на основі різних співвідношень ензиму і наночастинок золота в біоселективному елементі. Концентрація субстрату – 2 мМ ацетилхоліну.

Було отримано калібрувальні криві для біосенсора на основі ензиму АцХЕ та наночастинок золота різних розмірів, які продемонстрували, що найкращою чутливістю до субстрату характеризувались біосенсиори на основі наночастинок золота 30 нм. Окрім самих калібрувальних кривих для аналізу шуму, дрейфу та мінімальної границі визначення оцінювали параметри реальних відгуків біосенсорів на різні концентрації АцХХ. Показано перспективність створення біосенсорів шляхом коїмобілізації холінестераз з наночастинами золота.

Було проведено детальне дослідження біохімічних параметрів іммобілізованих холінестераз, а саме констант Міхаеліса-Ментена та констант інгібування. Ефективні значення констант та типи інгібування холінестераз різними токсинами розраховували за допомогою класичних графічних методів. Отримані нами величини добре корелюють з константами Міхаеліса, отриманими іншими дослідниками за подібних умов для розчинених сироваткових БуХЕ коня та людини. Це певною мірою свідчить про відсутність значних конформаційних змін іммобілізованих в парах глутарового альдегіду бутирилхолінестераз.

Тип інгібування соланіном, чаконіном та томатином визначали в координатах Діксона та Корніш-Боудена. Встановлено, що всі досліджувані інгібітори по відношенню до обох ферментів є оборотними. Для БуХЕ з сироватки крові коня показано повне конкурентне інгібування соланіном, чаконіном та томатином. В координатах Діксона лінеаризовані криві пересікаються у другому квадранті, в той же час в координатах Корніш-Боудена прямі є практично паралельними, що свідчить про конкурентний характер інгібування. У випадку БуХЕ з сироватки крові людини ідентифікувати тип інгібування виявилось важче: в координатах Діксона томатин показав конкурентне інгібування (прямі пересікаються в другому квадранті), тоді як прямі в координатах Корніш-Боудена очевидно пересікаються в третьому квадранті, що разом свідчить про, скоріше, змішаний тип інгібування. Змішане інгібування демонструють також соланін та

чаконін, до яких БуХЕ людини виявляється на порядок чутливішою порівняно з БуХЕ коня. Найпотужнішим інгібітором обох БуХЕ виявився чаконін, найменш сильним для БуХЕ коня – соланін, для БуХЕ людини – томатин. Суттєво різна чутливість БуХЕ коня та людини до глікоалкалоїдів дозволяє адаптувати характеристики біосенсора в залежності від практичних потреб.

Також досліджувався синергізм дії різних токсинів на активність холінестераз. Його визначали методом ізобольних діаграм. Показано, що у всіх випадках інгібування іммобілізованої бутирилхолінестерази різними сумішами глікоалкалоїдів ми маємо ефект додавання, тобто інгібування окремими компонентами і їх сумішню просто сумується, а не збільшується в декілька разів, як у випадку синергізму.

Було проведено математичне моделювання ферментативних процесів в мембрані з іммобілізованими холінестеразами. Модель представлена системою семи лінійних диференціальних рівнянь, які описують динаміку біохімічних реакцій в процесі інгібування. При цьому кожне із рівнянь описує концентрації всіх учасників реакції в залежності від часу. Система диференціальних рівнянь, яка описує математичну модель функціонування біосенсора для визначення α -чаконіну, розв'язувалась чисельно за допомогою програмного забезпечення Wolfram Mathematica 10 та вбудованого NDSolve алгоритму. Були підібрані відповідні константи таким чином, щоб змодельований відгук максимально співпадав із експериментальним відгуком біосенсора (рис. 5).

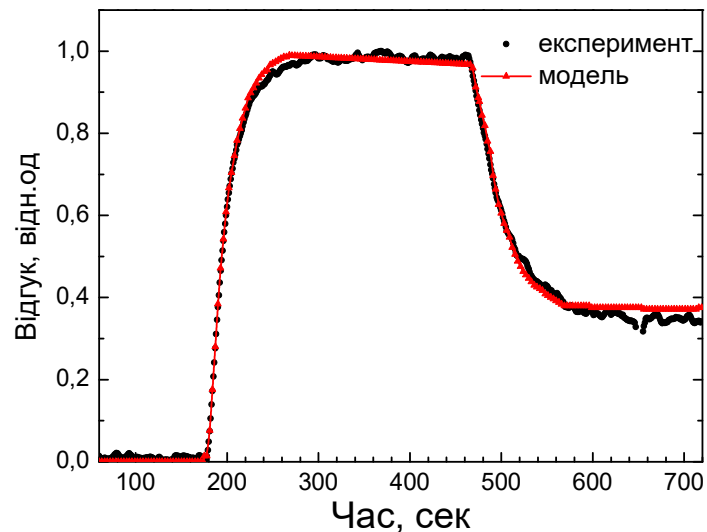
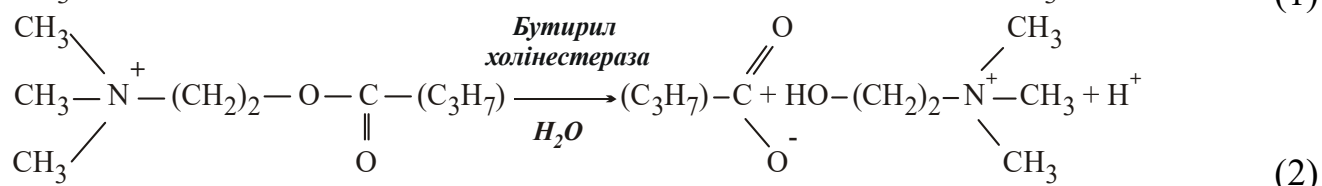
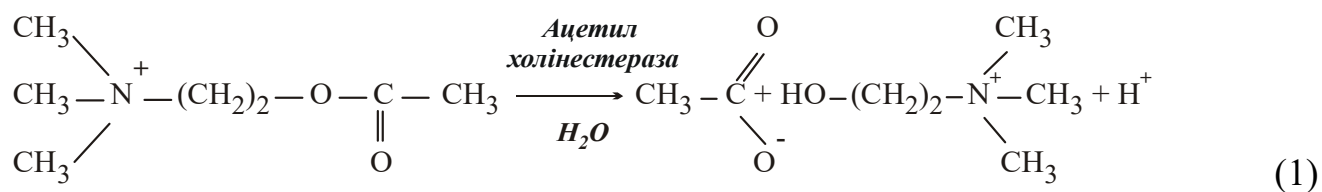


Рис. 5. Моделювання ензиматичних реакцій в мембрані біосенсора з використанням метода кінетичних рівнянь та експериментальних даних.

Підібрані константи були використанні для моделювання відгуків біосенсора на додавання субстратів та інгібіторів. Отримані результати чисельного моделювання є особливо актуальними при розробці нових біосенсорів та при роботі із токсичними речовинами.

Таким чином, розроблено, досліджено та оптимізовано метод іммобілізації холінестераз на поверхню електрохімічних перетворювачів.

Дослідження можливостей використання холінестераз в складі електрохімічних біосенсорів та створення їхніх лабораторних прототипів. Робота біосенсорів на основі холінестераз базується на наступних ферментативних реакціях:



В результаті цих ферментативних реакцій генеруються протони, що призводить до зміни рН чи провідності розчину всередині мембрани, тому ми можемо використовувати для створення біосенсорів потенціометричні датчики на основі рН-чутливих польових транзисторів чи кондуктометричні перетворювачі для визначення зміни провідності.

Обидва ферменти відповідають за гідроліз як ацетилхоліна, так і бутирилхоліна, але з різним ступенем спорідненості до цих субстратів і демонструють різну афінність до ряду інгібіторів. Деякі класи хімічних токсинів, такі як органофосфорні та карбаматні пестициди, глікоалкалоїди, та інші проявляють себе як інгібітори холінестераз. Біосенсиори на основі холінестераз знайшли своє застосування саме завдяки можливості їх використання для визначення слідових кількостей токсичних сполук, інгібіторів холінестераз, у довкіллі. Для біосенсорів такого типу, активність іммобілізованого ензиму вимірюється до і після інгібування, що дозволяє оцінити рівень інгібування, який, в свою чергу, пропорційний концентрації токсичної речовини. Тому необхідно було дослідити можливості застосування холінестераз в складі електрохімічних біосенсорів на основі ефекту інгібування ензимів. Від типу інгібування залежить і тип токсинів, на які розробляються біосенсиори.

У випадку біосенсорів на основі необоротного інгібування, після відгуку сенсора на субстрат (A_0) біосенсиори інкубують в розчині інгібітора протягом певного часу, а потім відмивають від надлишку інгібітора та знову отримують відгук на субстрат (A_i) (рис. 6).

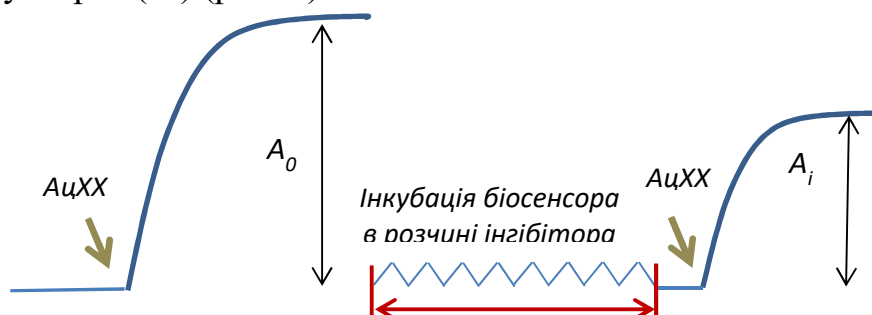


Рис. 6. Схема інгібіторного аналізу при необоротному інгібуванні

У разі оборотного інгібування, інгібітор додається безпосередньо у вимірювальну комірку після отримання відгуку на субстрат (рис. 7). Для повторного проведення процедури вимірювання необхідне тільки відмивання біосенсора робочим буферним розчином.

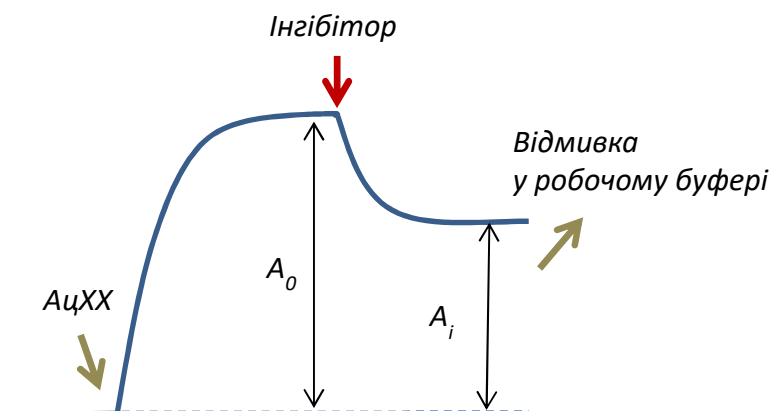


Рис. 7. Схема інгібіторного аналізу при оборотному інгібуванні

Рівень інгібування розраховується наступним чином:

$$I = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

Було проведено повний комплекс досліджень з розробки та оптимізації біосенсора на основі необоротного інгібування холінестераз фосфорорганічними пестицидами та карбаматними гербіцидами, а саме вибір кращого ензима, необхідної концентрації субстрату, часу інкубування в розчинах токсинів, реактивації ензима після інгібування, тощо. Показано, що найкраща чутливість до пестицидів та точність вимірювань досягається при концентраціях АцХХ вище 2,0 мМ. Час інкубації 20 хв було обрано як компроміс між ефективністю інгібування та загальним часом аналізу. При збільшенні концентрації буферного розчину від 1 мМ до 20 мМ, вихідний сигнал на додавання субстрату зменшувався у 8-10 разів. У той же час, рівень інгібування не залежав від концентрації буферу. Подібні результати були також отримані і для залежності відгуку сенсора від концентрації NaCl у робочому розчині. Таким чином варіація буферної ємності чи іонної сили не є важливим параметром при визначенні інгібіторів.

Інгібування іммобілізованих холінестераз фосфорорганічними пестицидами є досить сильним та необоротним, тому за звичайних умов відмивання фермент не відновлює свою активність протягом тривалого часу, що зумовлює одноразове використання датчика. Питання реактивації іммобілізованої холінестерази, що інактивується необоротними інгібіторами, є дуже важливим, тому що реактивація дозволяє багаторазово використовувати біосенсор для визначення концентрацій фосфорорганічних пестицидів. Показано, що піридин-2-альдоксим метйодид майже повністю реактивує активність холінестераз.

Калібрувальні криві кондуктометричного біосенсора на основі АцХЕ для різних пестицидів наведено на рис. 8.

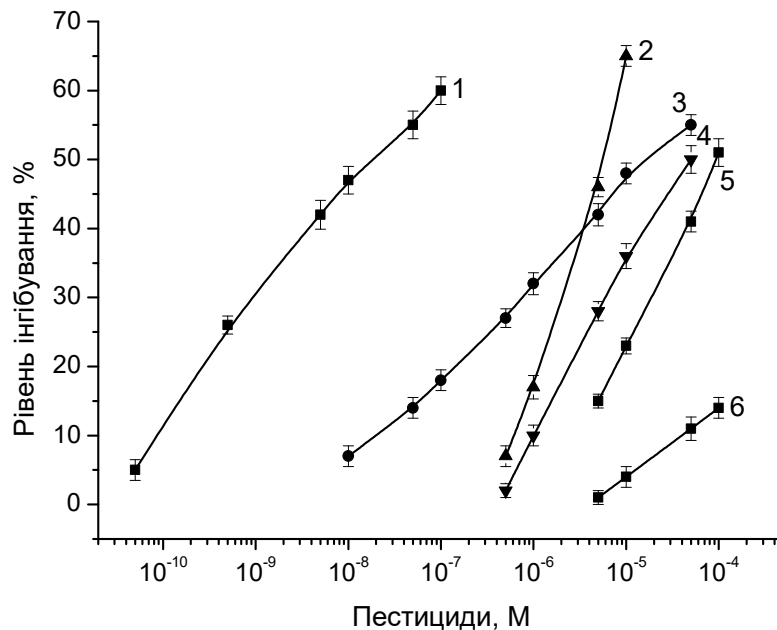


Рис. 8. Калібрувальні криві кондуктометричного біосенсора на основі АцХЕ для визначення діізопропілфторфосфату (1), трихлорфону (2), параоксон-етилену (3), параоксон-метилу (4), карбофурану (5) та паратіон-метилу (6). Вимірювання проводили у трьох повторах у 5,0 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, використовуючи 2,0 мМ АцХХ та 20 хв час інгібування

Було отримано криві, лінійні за напівлогарифмічним масштабом для всіх випробуваних пестицидів. Межі виявлення визначалися як концентрація інгібітора, що призводить до трикратного зменшення величини сигналу субстрату по відношенню до величини шумів, і становили: $5,0 \times 10^{-11}$ М для діізопропілфторфосфату, $1,0 \times 10^{-8}$ М для параоксон-етилену, $5,0 \times 10^{-7}$ М для параоксон-метилу, $3,0 \times 10^{-7}$ М для трихлорфону, $5,0 \times 10^{-6}$ М для паратіон-метилу та $2,0 \times 10^{-6}$ М для карбофурану. Аналітичні характеристики біосенсорів на основі двох різних перетворювачів виявилися досить близькими одна до одної як щодо меж виявлення, так і динамічного діапазону для різних пестицидів.

Наступним біосенсором, що ми розробляли, є біосенсор на основі оборотного інгібування холінестераз такими токсинами як глікоалкалоїди. Це природні токсини, що виконують роль натуральних фунгіцидів та інсектицидів картоплі та інших рослин переважно родини пасльонових.

Було проведено повний комплекс досліджень з розробки та оптимізації такого біосенсора, а саме вибір кращого ензима, необхідної концентрації субстрату, вивчено залежність від параметрів середовища, тощо.

Залежність залишкової активності іммобілізованої БуХЕ та АцХЕ від концентрації α -чаконіну показана на рис. 9. Як видно з рисунку, біосенсор на основі БуХЕ є більш чутливим до α -чаконіну, ніж біосенсор на основі АцХЕ. Для інших типів алкалоїдів, таких як α -соланін та соланідін, були отримані подібні результати.

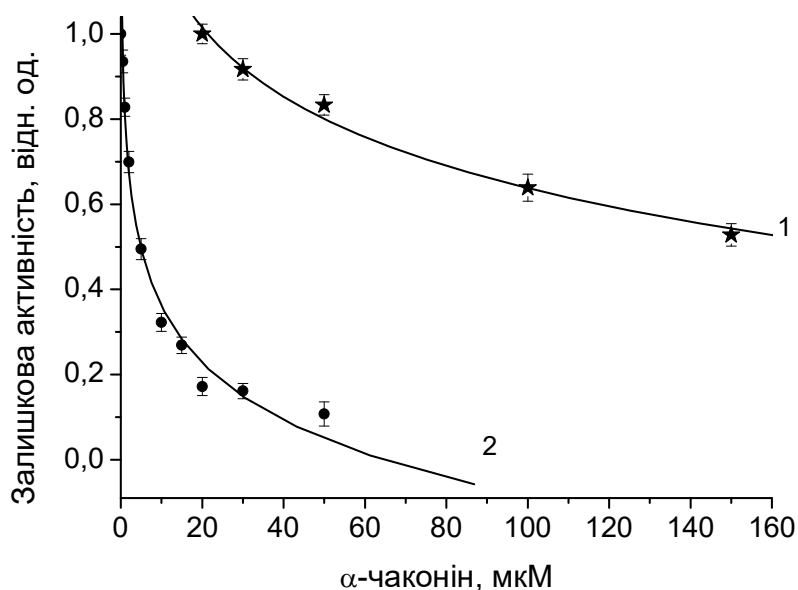


Рис. 9. Залежність залишкової активності іммобілізованих АцХЕ (1) та БуХЕ (2) від концентрації α -чаконіну. Відгук біосенсора на додавання 1 мМ субстрату вимірювали у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,4

Найкраща чутливість та точність вимірювань були досягнуті для концентрації БуХХ близько 1 мМ. Найвищий відгук біосенсора на додавання субстрату був отриманий для буферного розчину рН 7,2, тоді як рівень інгібування не залежав від рН розчину у дослідженому діапазоні рН. Зміна концентрації буфера та NaCl не є важливим параметром для визначення глікоалкалоїдів і не впливає на рівень інгібування.

На рис. 10 представлено калібрувальні криві для виявлення глікоалкалоїдів α -соланіну та α -чаконіну та їх аглікону соланідіну.

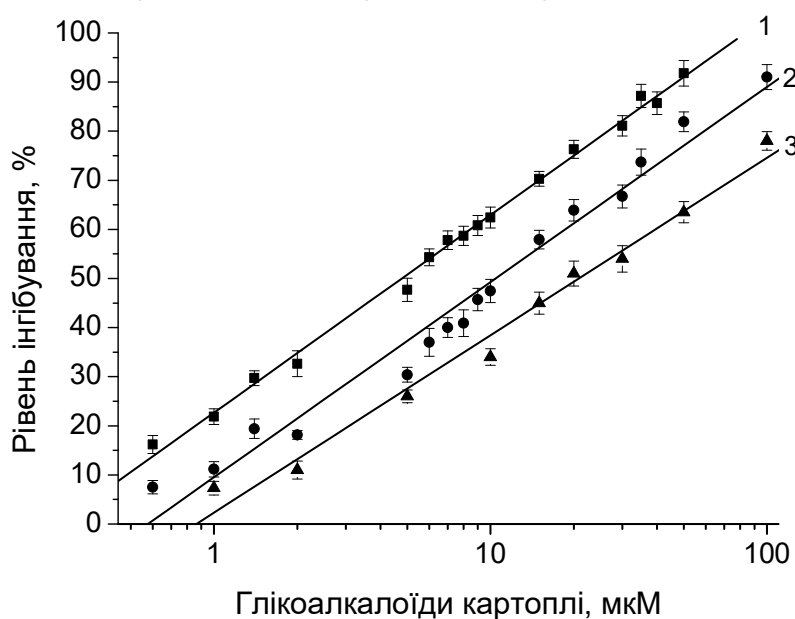


Рис. 10. Калібрувальні криві для виявлення α -чаконіну (1), α -соланіну (2) та соланідіну (3) за допомогою біосенсора на основі БуХЕ та рН-ІСПТ. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2 та 1 мМ БуХХ

Як бачимо, загальний вміст глікоалкалоїдів картоплі може бути виявлений в межах 0,2-100 мкМ залежно від типу алкалоїду, з межами виявлення 0,2 мкМ для α -чаконіну, 0,5 мкМ для α -соланіну та 1 мкМ для соланідіну.

На рис. 11 представлено калібрувальні криві для виявлення глікоалкалоїдів томатів, а саме томатину та його аглікону томатидіну.

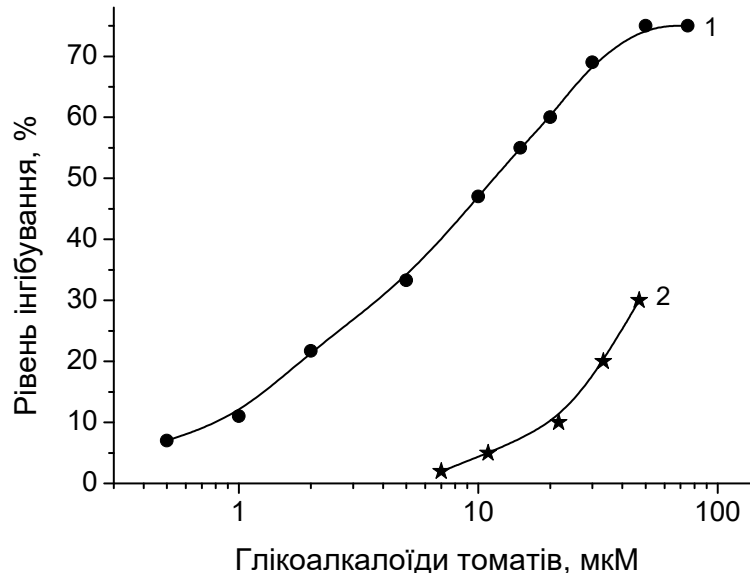


Рис. 11. Калібрувальні криві для виявлення томатину (1) та томатидіну (2) за допомогою біосенсора на основі БуХЕ та рН-ІСПТ. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2 та 1 мМ БуХХ

Як видно, томатин можна виявити в межах 0,5–50 мкМ з межами виявлення 0,2 мкМ. Динамічні діапазони показують, що такі біосенсори підходять для кількісного виявлення томатину у зразках томатів.

Іншим біосенсором, що ми розробляли, є біосенсор на основі оборотного інгібування холінестераз мікотоксинами, а саме афлатоксинами. Це дуже небезпечні токсини, які є продуктом життєдіяльності мікроскопічних грибів *Aspergillus flavus* та *Aspergillus ochraceus* і можуть утворюватися в багатьох харчових продуктах при порушенні режимів зберігання.

Було проведено повний комплекс досліджень з розробки та оптимізації такого біосенсора, а саме вибір кращого ензима та його концентрації, оптимальної концентрації субстрату, вивчення залежності від параметрів середовища, стабільності роботи та синергізму. Кращим для визначення афлатоксинів виявився ензим ацетилхолінестераза, найбільший рівень інгібування спостерігався при концентрації ферменту в мембрані 1%, а концентрації субстрату АцХХ – 4 мМ.

При вивченні чутливості біосенсора на основі АцХЕ до афлатоксинів було показано, що біосенсор характеризувався лінійним діапазоном визначення в межах від 0,5 мкМ до 20 мкМ при побудові калібрувальної кривої в напівлогарифмічних координатах (рис. 12).

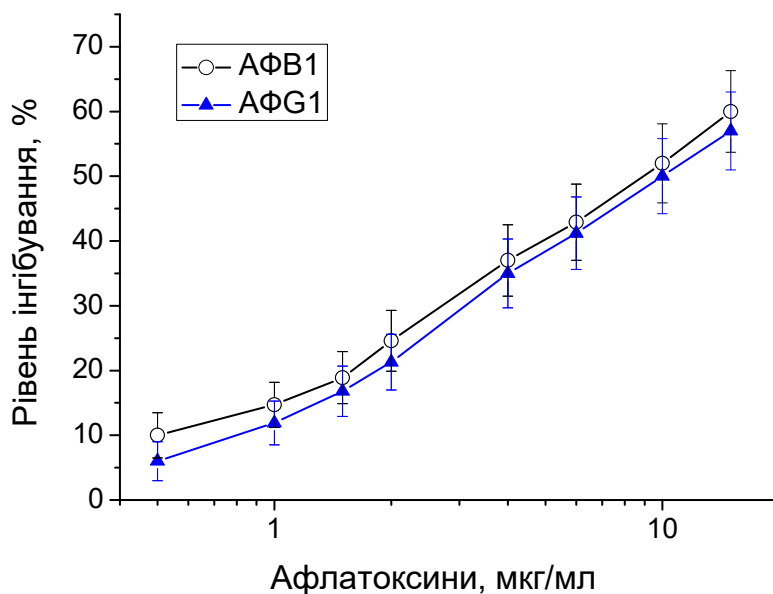


Рис. 12. Залежність рівня інгібування біосенсора від концентрації афлатоксину В1 та G1. Виміри проводились в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,0, концентрація АцХХ – 4 мМ, при кімнатній температурі

Також з рисунку видно, що чутливості біосенсора до АФВ1 і АФГ1 подібні (криві майже не відрізняються з урахуванням похибки вимірювання). Цілком логічно припустити, що величини відгуків на афлатоксин В2 будуть близькими до величин відгуків на АФВ1, і аналогічно з відгуками на афлатоксин G1 та G2. Це є досить цікавим результатом виходячи з того, що деякі мікроміцети роду *Aspergillus* можуть продукувати обидві групи токсинів. Якщо АФВ1 і АФГ1 при взаємодії мають адитивний ефект, то використовуючи калібрувальну криву для визначення АФВ1 можна визначати загальну концентрацію всіх афлатоксинів у зразку. Використовуючи метод ізоболограм було показано, що афлатоксин В1 інгібує іммобілізовану ацетилхолінестеразу дещо більше за афлатоксин G1, а їхній суміші притаманний ефект додавання, за якого рівень інгібування сумішшю складається із суми рівней інгібування окремих компонент. Таким чином використовуючи ацетилхолінестеразний біосенсор можна вимірювати сумарну концентрацію афлатоксинів у зразку.

Була оцінена одна з найважливіших характеристик біосенсора – операційна стабільність відгуків. Показано, що біосенсор характеризувався досить високою відтворюваністю сигналів, отриманих як при прямому визначенні субстрату, так і при інгібіторному визначенні АФВ1. Похибка не перевищувала 2,3% для визначення субстрату та 19,7% для визначення АФВ1. Дослідження стабільності при зберіганні продемонстрували, що потенціометричні біосенсори на основі АцХЕ можуть зберігатися більше двох місяців при зберіганні при температурі $+2^{\circ}\text{C}$ – $+5^{\circ}\text{C}$.

Іншим біосенсором, що ми розробляли, є біосенсор на основі інгібування холінестераз поверхнево активними речовинами. Вони дуже широко

застосовуються в промисловості та побуті. Їхнє виробництво досить дешеве і тому дуже масштабне, але їх негативний вплив на екологію всім добре відомий.

Було проведено комплекс досліджень з розробки та оптимізації такого біосенсора, а саме вибір умов іммобілізації ензима, процедури аналізу, вивчення залежності від параметрів середовища, стабільності, тощо.

Оптимальний час іммобілізації ацетилхолінестерази в БСА матриксі в парах глутарового альдегіду складав 35 хв. Аналізуючи отримані дані по впливу характеристик розчину на роботу біосенсора при прямому та інгібіторному аналізах, було вирішено використовувати 5 мМ фосфатний буфер, рН 6,0, та постійно контролювати іонну силу.

За оптимальних умов роботи біосенсора, була досліджена залежність швидкості інгібування біоселективного елементу від концентрації бензалконіум хлориду (рис. 13а) та додецилсульфат натрію (рис. 13б) .

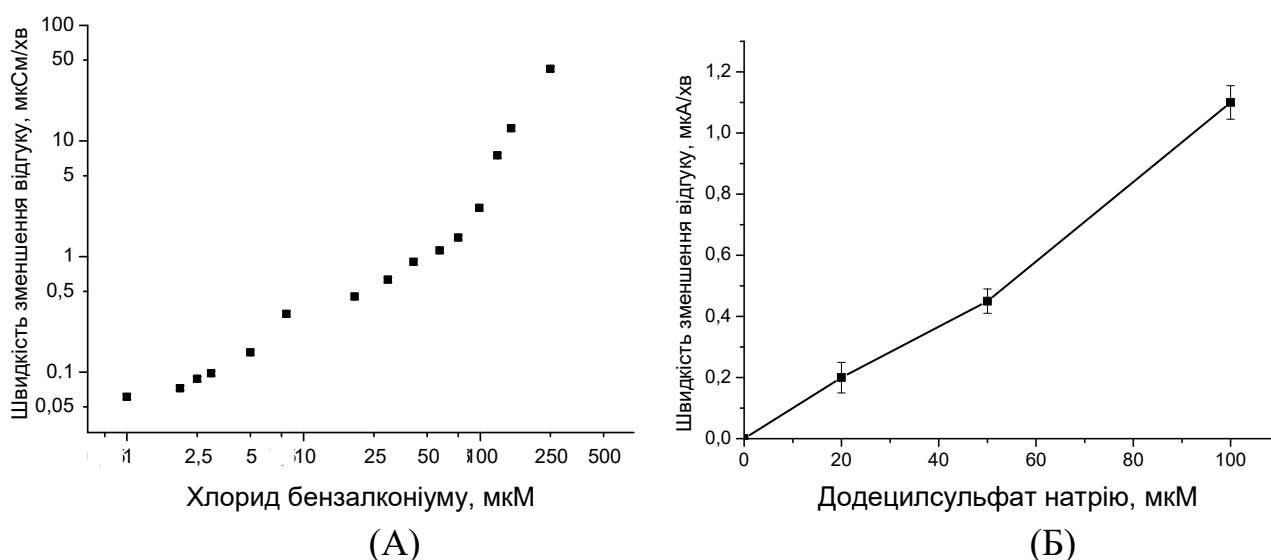


Рис. 13. Калібрувальний графік для визначення концентрації бензалконіум хлориду кондуктометричним біосенсором (А) та додецилсульфат натрію біосенсором на основі рН-ІСПТ (Б). Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 6,0, концентрація субстрату – 3 мМ.

Розроблений біосенсор характеризувався високою відтворюваністю сигналів як при прямому визначенні основного субстрату – ацетилхоліну, так і при інгібіторному визначенні поверхнево активних речовин. Стандартне відхилення для визначення ацетилхоліну становило $\pm 1,9\%$, а для визначення бензалконіум хлориду – $\pm 11\%$.

Ще одним біосенсором, що ми розробляли, є біосенсор на основі інгібування холінестераз індольними алкалоїдами. Це алкалоїди, які володіють фізіологічною активністю, яка пов'язана з дією на центральну і периферичну нервові системи. З давнини їх джерелом були корені Раувольфії зміїної. Зараз вони застосовуються у сучасній медицині та фармакології при гіпертензіях, аритміях та при лікуванні судинних захворювань. Сучасні умови дефіциту природної сировини – коренів Раувольфії зміїної – потребують розробки нових біотехнологій, які виконуються у відділі генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики.

Нами було проведено комплекс досліджень з розробки та оптимізації біосенсора для визначення аймаліну в культурі клітин Раувольфії зміїної. Як результат отримано калібрувальну криву для визначення аймаліну (рис.14).

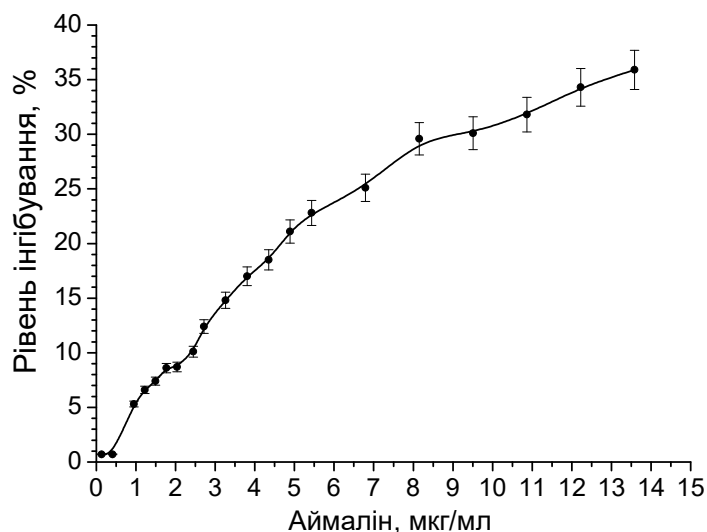


Рис. 14. Крива інгібування біосенсора на основі АцХЕ від концентрації аймаліну, який знаходиться в соці, отриманому із культури тканин раувольфія зміїна.

Біосенсори на основі холінестераз можна використовувати для аналізу вмісту індольних алкалоїдів. Більш того, варіюючи параметри біоселективного елемента – вибір ферменту АцХЕ або БуХЕ, процентний вміст ферменту в селективної мембрані, можна підбирати біосенсор з більш придатними робочими характеристиками (динамічний діапазон, чутливість). Біосенсори на основі БуХЕ володіють вищою чутливістю, а АцХЕ сенсори демонструють більш широкий динамічний діапазон роботи.

Таким чином створено лабораторні прототипи біосенсорів на основі холінестераз для визначення пестицидів, глікалкалоїдів, афлатоксинів, поверхнево активних речовин та індольних алкалоїдів. Розроблені біосенсори не виступають проти традиційних аналітичних методів. Це додаткова система швидкого та раннього попередження про наявність небезпечних речовин. Більш точні, але трудомісткі та дорогі традиційні методи можуть бути використані для подальшої валідації та додаткових досліджень зразків навколишнього середовища, попередньо випробуваних на масивах біосенсорів.

Застосування біосенсорів на основі холінестераз для аналізу реальних зразків та верифікація отриманих результатів. Після розробки лабораторних прототипів біосенсорів на основі холінестераз, виникає питання аналітичного застосування останніх для роботи з реальними зразками. Більшість дослідників досить часто показують лише принципову можливість створення відповідного біосенсора без його апробації з реальними біологічними зразками. Це пов'язано з тим, що останній етап розробки, який присвячено саме апробації біосенсорів, є дуже громіздким. Відповідно, в подальшому, при спробі налагодження промислових зразків біосенсорів, можуть виникнути проблеми, пов'язані з їхнім

використанням в реальних умовах. Вирішення цих проблем може призвести до зміни конструкції біосенсора, додаткових затрат часу та грошей, а іноді, ці проблеми, унеможлиблюють таку розробку 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 електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз та провести валідацію результатів традиційними методами визначення

Запропоновано загальну методику оптимізації та адаптації лабораторних прототипів біосенсорів на основі холінестераз для роботи з реальними зразками, яка складається з наступних етапів:

- ✓ Оптимізація протоколу вимірювань
- ✓ Розроблення методики попередньої підготовки зразків для аналізу
- ✓ Верифікація результатів за допомогою традиційних методів
- ✓ Проведення аналізів

Ферментний біосенсор на основі бутирилхолінестерази для визначення глікоалкалоїдів було протестовано на реальних зразках картоплі. Соланін та чаконін складають 95 % всіх алкалоїдів картоплі. Їх нормальний вміст – до 250 мг на кілограм ваги, але в зеленій чи інфікованій картоплі може зростати до 5000 мг. В помідорах знаходиться менш токсичний алкалоїд – томатин, особливо високий його вміст в зелених помідорах.

Перш за все необхідно було відпрацювати протокол визначення глікоалкалоїдів. Для проведення аналізу складу глікоалкалоїдів в картоплі було запропоновано два протоколи проведення вимірювань (рис. 15).

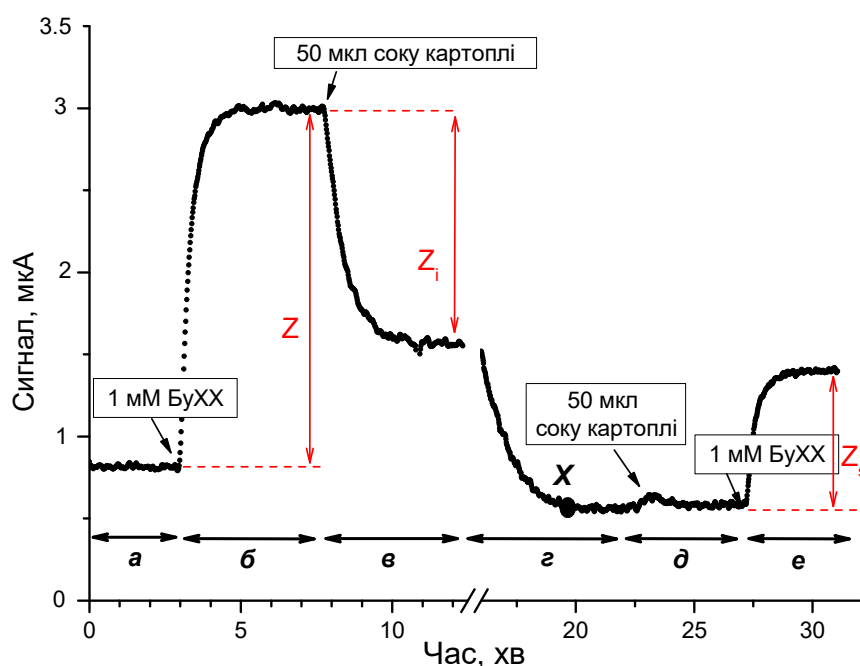


Рис. 15. Сигнал біосенсора та його відгук на внесення в комірку БуХХ та зразку соку картоплі. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5

Перший демонструє більш точну процедуру, при якій відбувається постійне підкалібрування сенсора. Другий показує більш швидку процедуру, коли сік картоплі вноситься перед додаванням субстрату. Видно, що кінцеві результати однакові, тобто ми можемо використовувати обидва протоколи вимірів. Активність ферменту повністю відновлюється шляхом простого відмивання біосенсора в робочому буфері. Сенсори можна використовувати багаторазово без додаткових процедур реактивації біоселективних елементів.

Детально відпрацьовувалася методика підготовки проб картоплі до аналізу. Як розчинник для кращої екстракції запропоновано додавання оцтової кислоти в сік картоплі до кінцевої концентрації 5 мМ і центрифугування проб, тому що це стабілізує відгуки сенсора.

Із літературних джерел відомо, що генетично зумовлений склад глікоалкалоїдів може збільшуватись при зберіганні, транспортуванні та механічних пошкодженнях зібраного врожаю. Тому для відпрацювання методики аналізу було важливо дослідити, чи впливають ці фактори на весь врожай в цілому, чи по-різному на окремі клубні. Досліджували рівень інгібування БуХЕ соком, отриманим з різних клубнів одного сорту картоплі. На рис. 16 представлено результати, що демонструють, що в середньому вміст глікоалкалоїдів в клубнях одного сорту співпадає, але інколи мають місце випадіння, коли концентрація алкалоїдів збільшується в 1,5-2 рази, що зумовлено, скоріш за все, зовнішніми факторами. Тому для мінімізації експериментального розкиду відгуків, викликаного вказаними вище зовнішніми факторами, у подальшому при отриманні соку для аналізу для гомогенізації використовували мінімум 5 різних клубнів картоплі одного сорту.

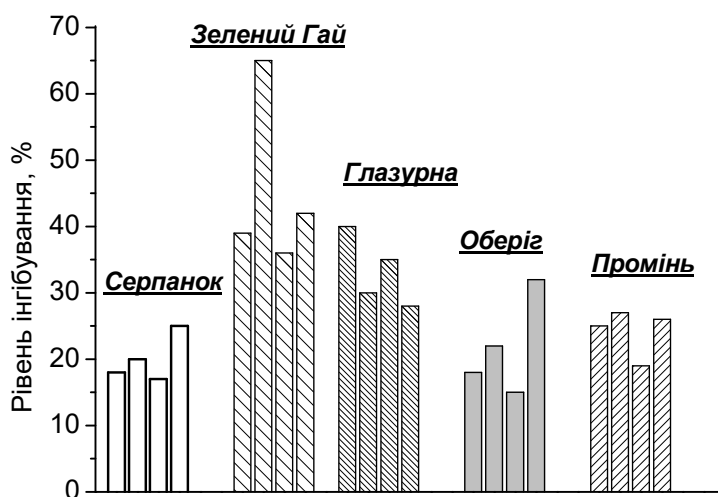


Рис. 16. Рівень інгібування БуХЕ соком, що отриманий з окремих клубнів різних сортів картоплі. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, концентрація субстрату 1 мМ.

Також було досліджено вплив на величину відгуку процедури очищення клубнів картоплі від шкірки при підготовці її до аналізу. На рис. 17 добре видно, що очищення картоплі призводить до практично двократного зменшення рівня

інгібування БуХЕ. Крім того, було також показано різницю впливу чищення клубнів на величину інгібування для різних сортів картоплі. В сортах картоплі з високим вмістом глікоалкалоїдів вплив очищення клубнів дещо менше ніж в сортах з малим вмістом глікоалкалоїдів. Однак, для масового скринінгу зручніше проводити аналіз без додаткових маніпуляцій очищення клубнів, але необхідно враховувати те, що результат буде завищено приблизно вдвічі.

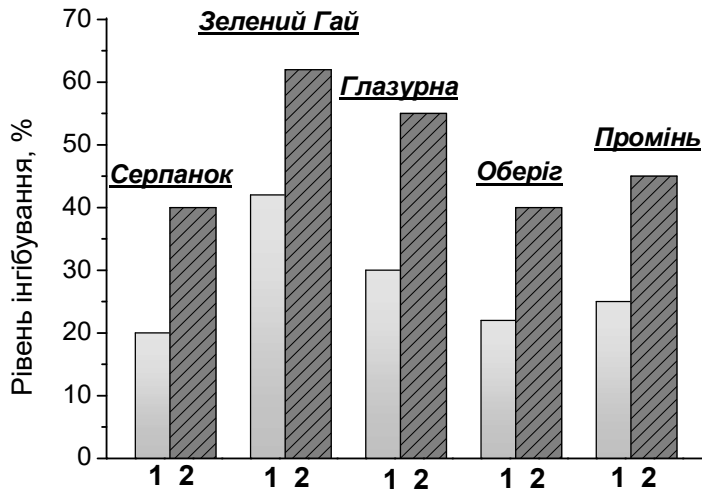


Рис. 17. Рівень інгібування БуХЕ соком картоплі різних сортів при використанні клубнів після очищення (1) та зі шкіркою (2). Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, концентрація субстрату 1 мМ.

Досліджено вплив зберігання готових для аналізу зразків соків картоплі та показано, що можливе довготривале зберігання готових зразків при заморожуванні без істотної зміни достовірності результатів аналізу. Експеримент проводили протягом двох років (рис. 18). В цілому спостерігалась достатньо висока кореляція результатів вимірювань.

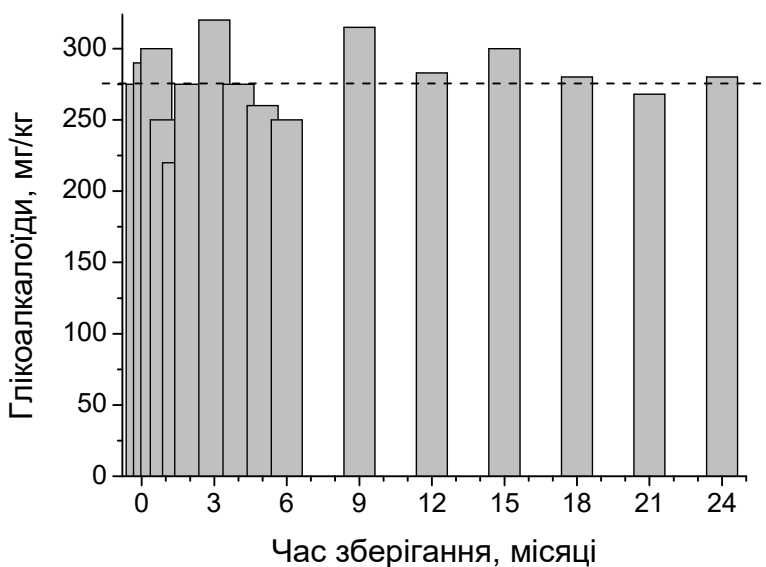


Рис. 18. Результати визначення концентрації ГА в замороженому соці картоплі сорту «Серпанок».

Всі ці попередні дослідження дозволили провести вимірювання вмісту ГА в більш ніж 30 сортах картоплі, наданих Інститутом картоплярства УААН і в 31 сорті картоплі, вирощених на експериментальній станції ARVALIS Інституту рослин (Франція).

Контрольні вимірювання вмісту глікоалкалоїдів картоплі проводили за допомогою HPLC. Клубні картоплі мили, сушили, гомогенізували, потім глікоалкалоїди екстрагували за допомогою оцтової кислоти. Екстракти концентрували і очищали за допомогою Sep-Pack® Plus C₁₈ картриджу. Сепарацію і кількісне визначення α -чаконіну і α -соланіну виконували на Zorbax Extend C₁₈ колонці (3,5мкм, 150×4,6 мм) при довжині хвилі 202 нм.

Отримані за допомогою біосенсора результати із загального вмісту глікоалкалоїдів в зразках картоплі з 31 різних експериментальних сортів у порівнянні з аналогічними даними аналізу за HPLC методом з попередньою складною обробкою зразків наведені на рис. 19. З рисунку видно високу кореляцію результатів. Деяка різниця в даних може бути пояснена різницею в процедурі підготовки зразків для різних методик аналізу, що може внести систематичну похибку в один чи інший метод.

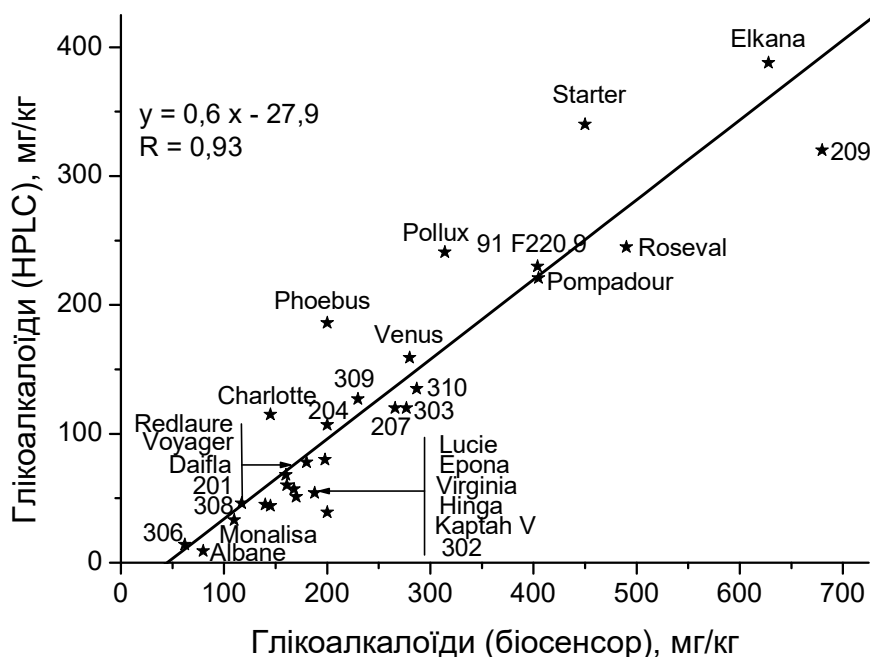


Рис. 19. Результати порівняльного аналізу вмісту глікоалкалоїдів в різних сортах картоплі, вирощеної на експериментальній станції картоплі ARVALIS Інституту рослин (Voigneville, Франція), отримані за допомогою біосенсора та HPLC.

Також були досліджені 7 різних комерційних сортів томатів на вміст томатину. Всі вони показали значення від 30 до 70 мг/кг плодів, що відповідало нормі.

Були досліджені соки різних овочів і фруктів на наявність глікоалкалоїдів (рис. 20).

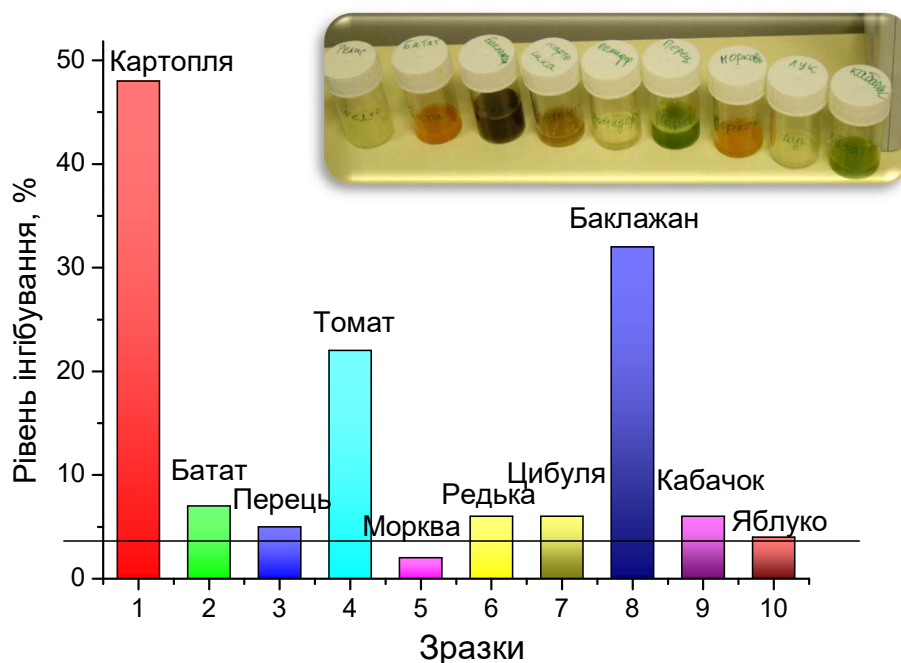


Рис. 20. Результати аналізу на вміст глікоалкалоїдів в різних овочах та фруктах

Найбільш токсичними виявилися соки картоплі, томатів і баклажанів, які і відносяться до сімейства пасльонових. Решта ж соків інгібували сенсор на величину до 7 відсотків, що є дуже низьким значенням, майже на рівні похибки.

Таким чином наш розроблений та оптимізований біосенсор на основі БуХЕ продемонстрував можливість аналізу глікоалкалоїдів в овочах і фруктах. Аналіз досить простий, не потребує складної підготовки зразків, та виконується протягом 15-20 хвилин.

Наступним етапом апробації біосенсорів для роботи з реальними зразками був ферментний біосенсор на основі ацетилхолінестерази для визначення афлатоксинів. В даному випадку процедура пробопідготовки більш складна, тому що її треба було узгодити з традиційними мікробіологічними методами екстракції АФ. Для початку був вибраний оптимальний розчинник для екстракції АФ із заражених зразків з урахуванням його мінімального впливу на роботу біосенсора. Ним виявився метанол, який в подальшому використовували при процедурі екстракції.

Як реальні зразки для тестування розробленого біосенсора були використані пшениця, овес, кукурудза та арахіс, спеціально заражені мікроскопічними грибами роду *Aspergillus*. Зразки були спеціально підготовлені в Інституті мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України. Продуцент афлатоксину В1 вирощували на субстратах (пшениця, овес, кукурудза та арахіс) протягом 21 доби.

Для проведення аналізу складу афлатоксинів в забруднених зразках зернових культур спочатку були відпрацьовані протоколи проведення вимірювань, що відповідали протоколам вимірювань в модельних зразках та враховували особливості роботи з запропонованим розчинником та екстрактами із реальних

зразків. Як контроль використовували екстракти, отримані за тією ж методикою з тих же субстратів, але не інфіковані *Aspergillus*.

Вимірювання проводили таким чином: спочатку отримували декілька тестових відгуків на 4 мМ субстрату. Потім проводили калібрування по об'єму контрольного зразка. Далі біосенсор ретельно відмивали в робочому буфері до відновлення відгуку і проводили калібрування за об'ємом для інфікованого зразка. На рис. 21 представлено результати цього експерименту для контрольного зразку та екстракту, отриманого із інфікованої пшениці.

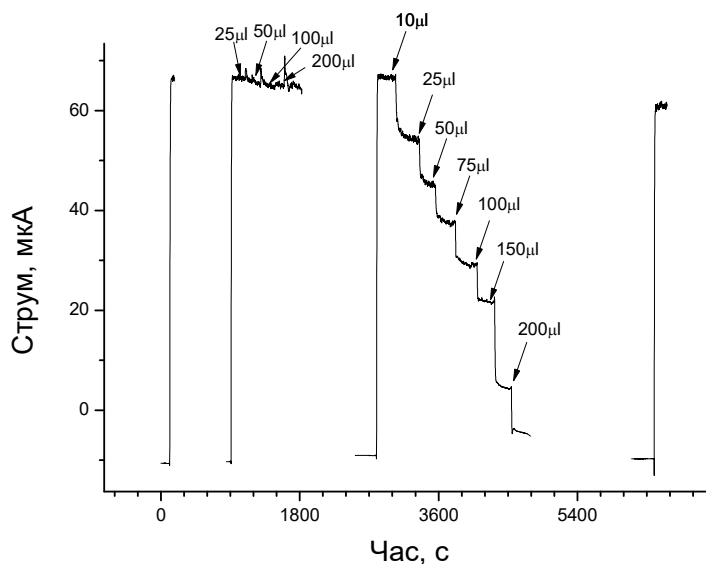


Рис. 21. Відгук біосенсора на додавання контрольного зразка та екстракту, отриманого із інфікованої пшениці.

З рисунку видно, що інгібування іммобілізованої АцХЕ контрольним зразком практично не відбувається, при цьому інфікований екстракт суттєво інгібує АцХЕ в складі біосенсора.

За таким же алгоритмом було проведено вимірювання для інших зразків заражених *Aspergillus* зернових та бобових культур. В таблиці представлено зведені дані цих вимірів.

Таким чином, наш розроблений та оптимізований біосенсор на основі АцХЕ продемонстрував можливість аналізу афлатоксинів в зразках зернових та бобових. Але разом із забруднювачами природного походження, харчові продукти можуть бути забруднені штучними токсинами, такими як пестициди. Ми використовували потенціометричний біосенсор на основі ацетилхолінестерази для роздільного визначення афлатоксинів і пестицидів в мультикомпонентному зразку. Недоліком АцХЕ сенсора є чутливість до широкого спектру токсичних речовин різної природи, а тому нам необхідно було розробити спеціальний протокол одночасного селективного визначення різних класів токсинів.

Механізм дії цих токсинів відрізняється, тому першочерговим завданням було відпрацювання оптимальної процедури інгібування, яка дозволила б визначати як кожен токсин окремо, так і обидва одночасно. Був підібраний алгоритм інгібування, який задовольняє вимогам і умовам як оборотного, так і необоротного інгібування.

Таблиця. Зведені дані вмісту мікотоксинів

№ зразка	Штам	Субстрат	Мікотоксини, мкг/мл
<i>Aspergillus flavus</i>			
1	801	Соя	582,5
2		Пшениця	193,2
3	973	Соя	479
4		Пшениця	128,5
5	NN	Соя	575
6		Пшениця	330
7	2979	Соя	225
8		Пшениця	246,7
9	Г30	Соя	1300
10		Пшениця	154
11	М	Соя	476
12		Пшениця	147
13	2980	Соя	330
14		Пшениця	420
15	1859	Соя	378
16		Пшениця	136
<i>Aspergillus ochraceus</i>			
17	3045	Кукурудза	292,5
18		Просо	291,5
19	3015	Кукурудза	202,5
20		Просо	217,5
КОНТРОЛЬ			
25		Пшениця	-
26		Просо	-
27		Соя	-
28		Кукурудза	-

Оптимізовано такі параметри роботи, як оптимальний час необоротного інгібування (30 хв), час реактивації ферменту (30 хв) і необхідна концентрація реактиватору ПАМ-2 (10 мМ).

Досліджено синергізм дії трихлорфону і АФ В1 при інгібуванні АцХЕ та продемонстровано ефект додавання.

На основі отриманих результатів нами запропоновано процедуру одночасного роздільного визначення трихлорфону та афлатоксину в мультикомпонентній суміші (рис. 22).

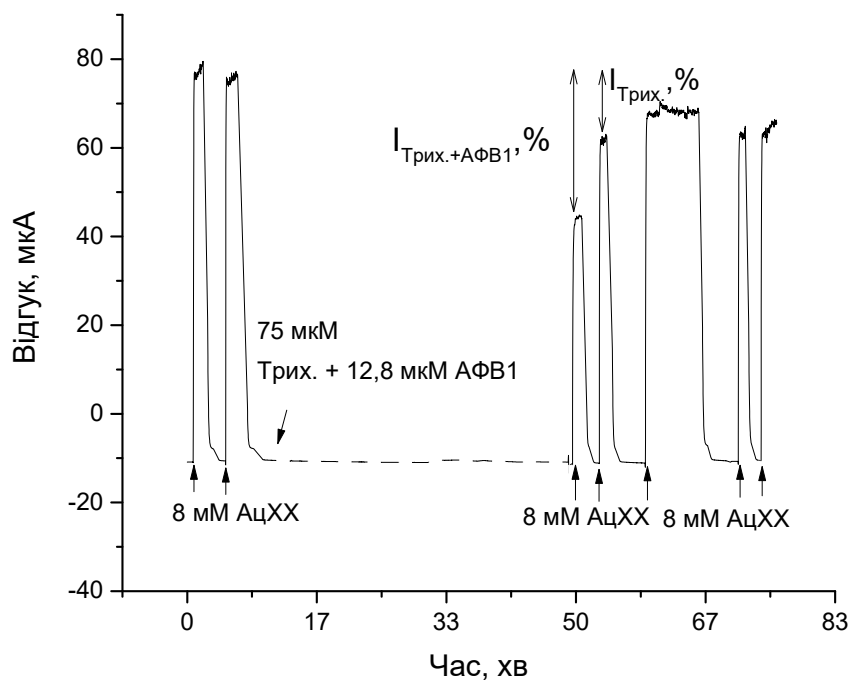


Рис. 22. Типові сигнали біосенсора при одночасному визначенні трихлорфону та афлатоксину В1 в суміші.

Спочатку отримували відгуки біосенсора на 8 мМ АцХХ. Після відмивки датчика буферним розчином, відбувалося додавання суміші токсинів безпосередньо у комірку з буферним розчином, чекали 3 хв з інтенсивним перемішуванням, після цього перемішування вимикали і чекали ще 30 хв. Потім знову відбувалось додавання субстрату АцХХ концентрацією 8 мМ і отримували відгук біосенсора. Рівень сумарного інгібування АцХЕ трихлорфоном та АФВ1 складав $I_{\text{Трих}} + I_{\text{АФВ1}} = 37,2\%$.

Після отримання відгуку біосенсор відмивали та отримували ще один відгук на внесення субстрату, який виявився більшим ніж попередній, що пояснюється тим, що афлатоксин В1 інгібує ацетилхолінестеразу оборотно на відміну від трихлорфону. Після відмивки біосенсора відгук на субстрат збільшився і рівень інгібування вже складав 16,8%, що відповідає необоротному інгібуванню ензима трихлорфоном. Виходячи з цього, можна з легкістю вирахувати інгібування кожного компонента окремо. Отже для пестициду трихлорфон рівень інгібування складає $I_{\text{Трих}} = 16,8\%$, а для афлатоксину В1 $I_{\text{АФВ1}} = 37,2\% - 16,8\% = 20,4\%$.

Для уточнення класу необоротних інгібіторів можна застосовувати процес селективної реактивації, що дає змогу розділити між собою пестициди та іони важких металів.

Таким чином, запропоновано та апробовано методику роздільного визначення токсинів різної природи за допомогою біосенсора на основі АцХЕ.

Аналіз і узагальнення результатів досліджень. Біосенсори на основі холінестераз знайшли своє широке застосування саме завдяки можливості їх використання для визначення слідових кількостей токсичних сполук, які є інгібіторами холінестераз. Але їх також можна використовувати в прямому

ензиматичному аналізі для визначення концентрації ацетилхоліну та бутирилхоліну. Крім того, інгібіторний ензиматичний аналіз в біосенсорах також застосовується в різних конфігураціях. Варіанти аналітичного застосування холінестераз в біосенсориці просумовано на рис. 23.

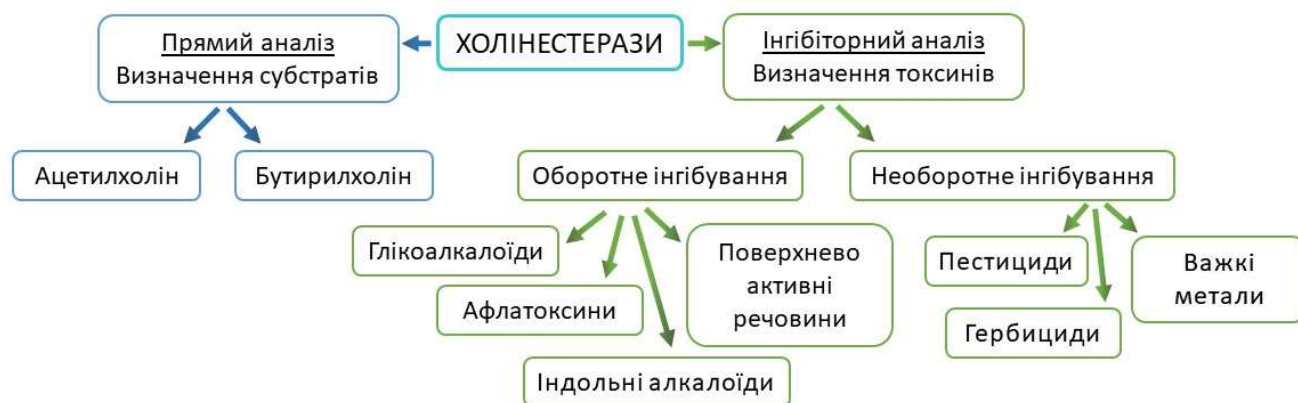


Рис. 23. Варіанти аналітичного застосування холінестераз при розробці біосенсорів

Спираючись на досвід та враховуючи труднощі, що виникали в процесі створення лабораторних прототипів електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз запропоновано покрокову процедуру створення електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз.

Перш за все необхідно визначитись з методом аналізу і відповідно типом перетворювачів. Кондуктометрія – дуже чутливий метод, що є його великою перевагою, але, іноді, і недоліком, тому що метод вимірювань дуже залежить від складу середовища і чутливий до змін в середовищі. Потенціометричний метод є менш чутливим, він базується тільки на зміні рН, і не реагує на зміни в середовищі, що не призводять до змін рН. Але технологія виготовлення кондуктометричних датчиків значно простіша за рН-чутливі польові транзистори. Показано, що у випадку біосенсорів для визначення пестицидів, гербіцидів та важких металів краще підходить кондуктометричний метод вимірювань завдяки тому, що процеси інгібування токсинами та вимірювання можна розділити. У випадку ж визначення алкалоїдів та афлатоксинів краще використовувати рН-чутливі польові транзистори.

Наступним етапом роботи зі створення електрохімічних біосенсорів є підготовка перетворювачів. Спочатку очищені перетворювачі тестувались на придатність до використання у розробці біосенсорів. За результатами тестування, при необхідності, поверхню перетворювачів модифікували з метою покращення їхніх робочих параметрів. Далі досліджувались аналітичні характеристики перетворювачів. За результатами перевірки обирались найкращі перетворювачі зі схожими характеристиками.

Визначившись з методом вимірювань та необхідними перетворювачами, необхідно вибрати відповідні вимірювальні установки, схеми чи портативні прилади для роботи з біосенсорами.

Далі переходять к процесу іммобілізації холінестераз на поверхню перетворювачів. Метод іммобілізації підбирають за такими параметрами як чутливість біосенсора до субстрату та інгібітору, межа вимірювання, лінійний діапазон, шум та дрейф базової лінії, стабільність протягом робочого дня. Також підбирають оптимальний склад мембрани на основі холінестераз: співвідношення ензиму та БСА, концентрацію зшиваючого агенту та інших компонентів біоселективного елементу, та визначають оптимальні умови проведення цієї іммобілізації.

Отримані біосенсиори тестують за різних умов функціонування (рН, іонна сила та буферна ємність розчину) з метою вибору оптимального робочого буферного розчину. Перевіряють стабільність біосенсорів, а саме відтворюваність відгуків біосенсорів при безперервній роботі протягом дня, операційну стабільність протягом декількох тижнів та стабільність при довготривалому зберіганні. Також досліджують мінімальну межу визначення та отримують калібрувальну криву, за якою визначається лінійний діапазон та чутливість.

Останнім етапом розробки є апробація отриманих біосенсорів при роботі в реальних умовах для підтвердження працездатності біосенсорів та можливості їх практичного використання. Отримані результати обов'язково порівнюють з даними традиційних методів аналізу. За умови високої кореляції результатів, розробку біосенсора можна вважати завершеною. В результаті отримуємо діючий лабораторний прототип електрохімічного біосенсора на основі холінестераз, що може бути основою для створення промислового зразку відповідного біосенсора.

В ході виконання роботи запропоновано детальну методику селективного аналізу токсичних речовин різної природи за допомогою біосенсора на основі холінестераз з використанням етапу селективної реактивації біомембрани.

Необхідним кроком успішного застосування біосенсорів на практиці є проведення комплексу метрологічних досліджень, що також було виконано. Відпрацьовано та стандартизовано низку процедур приготування калібрувальних розчинів субстратів та інгібіторів, що будуть визначатись біосенсорами на основі холінестераз, проведено розрахунки підсумкової концентрації розчинів та оцінку рівнів стандартної та розширеної невизначеності значень цих концентрацій. В ДП «Укрметртестстандарт» затверджено методику градування лабораторного прототипу приладу для вимірювання молярної концентрації стероїдних глікоалкалоїдів в картоплі № 975-36-11, методику градування лабораторного прототипу приладу для вимірювання молярної концентрації трихлорфону в воді № 976-36-11, методику градування лабораторного прототипу приладу для вимірювання молярної концентрації афлатоксину В1 № 1174-36-14.

Використання запропонованих методик буде необхідним при практичному застосуванні розроблених біосенсорів для використанні в харчовій промисловості та екологічному моніторингу.

ВИСНОВКИ

В результаті проведених досліджень вперше проаналізовано, систематизовано та розроблено низку електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз з використанням різних типів електрохімічних перетворювачів, процедури іммобілізації ензимів та методик вимірювань, що дозволило отримати обґрунтовані фундаментальні результати і розробити біотехнологічні основи застосування холінестераз в біосенсорах і перевірити їх ефективність для практичного використання в сільському господарстві та екологічному моніторингу.

1. Розроблено дизайн перетворювачів на основі рН-чутливих польових транзисторів та кондуктометричних металевих гребінчастих електродів та оптимізовано їх аналітичні характеристики, які враховували особливості роботи при електрохімічних вимірюваннях, що дозволило їх використання для створення біотехнологічних систем із застосуванням холінестераз як селективних елементів біосенсорів.
2. Розроблено та виготовлено експериментальні біоаналітичні системи різної конфігурації (в тому числі портативні), вимірювальні комірки різних модифікацій для подальшої роботи з біосенсорами на основі холінестераз.
3. Вперше досліджено та оптимізовано методи іммобілізації холінестераз на поверхню електрохімічних перетворювачів з урахуванням впливу модифікації поверхні на характеристики як самих перетворювачів так і біосенсорів в цілому, що дозволило запропонувати декілька варіантів покращеної процедури іммобілізації ензимів (в тому числі з використанням наночастинок), що є важливою складовою аналітичної біотехнології.
4. Визначено біохімічні параметри іммобілізованих на поверхні перетворювачів холінестераз (K_M , V_{max} , K_i , $i_{0,5}$) та вперше ідентифіковано типи інгібування в залежності від природи токсинів, що дозволяє моделювати взаємодію ензимів з інгібіторами на молекулярному рівні та дає змогу адаптувати характеристики сенсорів під конкретні прикладні біотехнологічні потреби завдяки суттєвій різниці в інгібуванні ацетил- та бутирилхолінестерази різними токсичними речовинами.
5. Результати математичного моделювання роботи потенціометричного біосенсора на основі бутирилхолінестерази для інгібіторного визначення α -чаконіну, що повністю описують біохімічні реакції, які відбуваються в ензимній мембрані біосенсора за участі субстратів та інгібіторів, вперше були застосовані для оптимізації роботи такої системи. Такі дослідження є новими та дуже важливими в аналітичній біотехнології для подальшого створення інших біосенсорів, особливо при роботі із токсичними речовинами.
6. Розроблені електрохімічні біосенсиори на основі ензимів ацетил- та бутирилхолінестераза з використанням різних процесів інгібування їхньої активності, дозволили створити низку діючих лабораторних прототипів для визначення концентрацій фосфорорганічних та карбаматних пестицидів (параоксон-метил, параоксон-етил, трихлорфон, паратіон-метил тощо),

глікоалкалоїдів та індольних алкалоїдів, деяких поверхнево активних речовин (бензалконіум хлорид та додецилсульфат натрію) та афлатоксину В1, які було оптимізовано для подальшої роботи з реальними зразками. Для частини отриманих біосенсорів проведено метрологічні дослідження, зокрема розроблено стандартизовані методики визначення, які затверджені в ДП «Укрметрестандарт».

7. За допомогою розроблених біосенсорів вперше проведено кількісний аналіз глікоалкалоїдів в клубнях більш як 60 різних сортів картоплі та томатів, показано високу кореляцію результатів, отриманих за допомогою біосенсора, з даними, які отримані за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії (коефіцієнт кореляції $R = 0,93$).
8. Створення діючих лабораторних прототипів біосенсорів на основі іммобілізованої ацетилхолінестерази вперше дало можливість провести кількісний аналіз афлатоксину В1 в зразках пшениці, сої, кукурудзи та проса, спеціально інфікованих мікроскопічними грибами *Aspergillus flavus* та *Aspergillus ochraceus*.
9. Розроблена та оптимізована процедура селективного біосенсорного визначення токсичних речовин дозволяє аналізувати складні мультикомпонентні зразки, в складі яких є як афлатоксини, так і пестициди.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

(* – особистий внесок здобувача)

Монографії (розділи монографій):

1. Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Arkhypova VN, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, El'skaya AV. Electrochemical enzyme biosensors. Kiev: Akademperiodika; 2006. 72 p. (* проаналізовано літературні джерела стосовно ензимних біосенсорів на основі потенціометричних датчиків).
2. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Conductometric enzyme biosensors. In: Marks RS, Lowe CR, Culen DC, Weetall HH, Karube I, editors. Handbook of Biosensors and Biochips. New Jersey: Wiley-Interscience; 2007. p. 379–394. (* проаналізовано літературні джерела стосовно кондуктометричної біосенсорів на основі холінестераз).
3. Arkhypova V. Enzyme biosensor based on ISFETs for determination of glycoalkaloids content in potato. In: Sibirny A, Fedorovych D, Gonchar M, Grabek-Lejko D, editors. Living organisms and bioanalytical approaches for detoxification and monitoring of toxic compounds. Rzeszow: University of Rzeszow; 2015. p. 99–112.
4. Shkotova L, Soldatkin O, Arkhypova V, Pyeshkova V, Saiapina O, Sergeyeva T, Soldatkin A, Dzyadevych S. Biosensors. Practical application. In: Stabnikova O, Shevchenko O, Stabnikov V, Paredes-López O, editors. Bioconversion of Food Industry Wastes: Transformation into Value-Added Products. Boca Raton: CRC

Press; 2023. p. 305–352. (* експерименти по визначенню глікоалкалоїдів в картоплі та афлатоксинів в зернових).

Статті у наукових фахових виданнях, що належать до бази даних Scopus

1. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, El'skaya AV, Jaffrezic-Renault N, Jaffrezic H, Martelet C. Multibiosensor based on enzyme inhibition analysis for determination of different toxic substances. *Talanta*. 2001;55:919–927. (* перевірено роботу іммобілізованої ацетилхолінестерази). Q1
2. Архипова ВН, Дзядевич СВ, Щувайло ОН, Солдаткин АП, Ельская АВ, Жафрезик-Рено Н, Жафрезик Г, Мартле К. Концепция мультибиосенсора для определения различных токсичных веществ на основе ферментного ингибиторного анализа. *Biopolym. Cell*. 2001;17(1):70–77. (* перевірено роботу іммобілізованих холінестераз). Q4
3. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Development and optimisation of biosensors based on pH-sensitive field effect transistors and cholinesterases for sensitive detection of solanaceous glycoalkaloids. *Biosens Bioelectron*. 2003;18:1047–1053. (* розроблено лабораторний прототип біосенсора для визначення глікоалкалоїдів). Q1
4. Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Korpan YI, Arkhypova VN, El'skaya AV, Chovelon J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Biosensors based on enzyme field effect transistors for determination of some substrates and inhibitors. *Anal Bioanal Chem*. 2003;377:496–506. (* участь в експериментах по визначенню іонів важких металів). Q2
5. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Enzyme biosensor for tomatine detection in tomatoes. *Anal. Letters*. 2004;37(8):1–14. (* розроблено лабораторний прототип біосенсора для визначення томатину). Q2
6. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Chovelon J-M, El'skaya AV, Soldatkin AP. Potentiometric biosensors based on ISFETs and immobilized cholinesterases. *Electroanalysis*. 2004;16:1873–1882. (* участь в експериментах по визначенню пестицидів). Q2
7. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Korpan YI, El'skaya AV, Gravouelle J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Application of enzyme field effect transistors for fast detection of total glycoalkaloids content in potatoes. *Sensors Actuators B*. 2004;103:416–422. (* оптимізація роботи біосенсорів для визначення глікоалкалоїдів). Q1
8. Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Arkhypova VN, El'skaya AV, Chovelon J-M, Georgiou C, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Early-warning electrochemical biosensor system for the environmental monitoring based on enzyme inhibition effect. *Sensors and Actuators B*. 2005;55:81–87. (* участь в експериментах по визначенню токсинів різного походження). Q1

9. Soldatkin AP, Arkhypova VN, Dzyadevych SV, El'Skaya AV, Gravouelle JM, Jaffrezic-Renault N, Martelet C. Analysis of the potato glycoalkaloids by using of enzyme biosensor based on pH-ISFETs. *Talanta*. 2005;66(1):28–33. (** участь в експериментах по визначенню глікоалкалоїдів в картоплі*). Q1
10. Бенілова ІВ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Жаффрезік-Рено Н, Мартле К, Солдаткін ОП. Кінетика функціонування іммобілізованих на поверхню рН-чутливих польових транзисторів бутирилхолінестераз та інгібуючий вплив на них стероїдних глікоалкалоїдів. *Укр Біохим журнал*. 2006;78(2):131–141. (** дослідження кінетики функціонування іммобілізованих на поверхню рН-чутливих польових транзисторів бутирилхолінестераз*). Q4
11. Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Жаффрезік-Рено Н, Мартле К, Солдаткін ОП. Дослідження взаємодії основних глікоалкалоїдів картоплі за інгібування ними іммобілізованої бутирилхолінестерази. *Укр Біохим журнал*. 2006;78(5):138–144. (** дослідження інгібування іммобілізованої на поверхню рН-чутливих польових транзисторів бутирилхолінестерази*). Q4
12. Benilova IV, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Soldatkin AP. Kinetics of human and horse sera cholinesterases inhibition with solanaceous glycoalkaloids: study by potentiometric biosensor. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2006;86(3):203–210. (** дослідження впливу глікоалкалоїдів на іммобілізовані бутирилхолінестерази різного походження*). Q2
13. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, Chovelon JM, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Potentiometric biosensors based on ISFETs and immobilised cholinesterases. *International Journal of applied electromagnetics and mechanics*. 2006;23(2–3):229–244. (** участь в експериментах по дослідженню інгібування холінестераз різними токсинами*). Q3
14. Солдаткін ОО, Назаренко ОА, Павлюченко ОС, Кукла ОЛ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Єльська ГВ. Оптимізація роботи ферментних біоселективних елементів як складових потенціометричного мультибіосенсора. *Biopolym. Cell*. 2008;24(1):41–50. (** оптимізація роботи бутирилхолінестерази в складі мультибіосенсора*). Q3
15. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Soldatkin AP. Biosensors for assay of glycoalkaloids in potato tubers. *Appl Biochem Microbiol*. 2008;44(3):314–318. (** аналіз глікоалкалоїдів в картоплі*). Q3
16. Pavluchenko AS, Kukla AL, Goltvianskyi YV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Investigation of stability of the pH-sensitive field-effect transistor characteristics. *Sensor Letters*. 2011;9:2392-2396. (** дослідження стабільності рН-чутливих польових транзисторів*). Q3
17. Soy E, Arkhypova V, Soldatkin O, Shelyakina M, Dzyadevych S, Warzywoda J, Sacco AJr, Akata B. Investigation of characteristics of urea and butyrylcholine chloride biosensors based on ion-selective field-effect transistors modified by the incorporation of heat-treated zeolite Beta crystals. *Material Science Engineering C*.

- 2012;32:1835-1842. (** дослідження впливу бета-цеолітів на характеристики біосенсора на основі бутирилхолінестерази*). Q1
18. Kucherenko IS, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Novel biosensor method for surfactant determination based on acetylcholinesterase inhibition. Measurement Science and Technology. 2012;23:1–6. DOI:10.1088/0957-0233/23/6/065801. (** участь в експериментах по розробці біосенсора для визначення поверхнево активних речовин*). Q2
 19. Soldatkin OO, Burdak OS, Sergeyeva TA, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Acetylcholinesterase-based conductometric biosensor for determination of aflatoxin B1. Sensors Actuators B. 2013;188:999–1003. (** участь в експериментах по розробці біосенсора для визначення афлатоксину B1*). Q1
 20. Soldatkin AP, Dzyadevych SV, Korpan YI, Sergeeva TA, Arkhypova VN, Biloivan OA, Soldatkin OO, Shkotova LV, Zinchenko OA, Peshkova VM, Sayapina OY, Marchenko SV, El'skaya AV. Biosensors. A quarter of century of R&D experience. Biopolym. Cell. 2013;29(3):188–206. (** узагальнення даних з розробок біосенсорів на основі холінестераз*). Q3
 21. Stepurska KV, Soldatkin OO, Kucherenko IS, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Feasibility of application of conductometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of toxic compounds of different nature. Anal Chim Acta. 2015;854:161–168. (** участь в експериментах по розробці біосенсора для визначення токсинів різного походження*). Q1
 22. Soldatkin OO, Shelyakina MK, Arkhypova VN, Soy E, Kirdeciler SK, Ozansoy Kasap B, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Akata Kurç B, Soldatkin AP, Dzyadevych SV. Nano- and micro-sized zeolites as a perspective material for potentiometric biosensors creation. Nanoscale Research Letter. 2015;10:59. DOI 10.1186/s11671-015-0768-8. (** дослідження впливу цеолітів на характеристики потенціометричного біосенсора на основі холінестерази*). Q2
 23. Stepurska KV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Dzyadevych SV. Development of novel enzyme potentiometric biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for aflatoxin B1 analysis in real samples. Talanta. 2015;144:1079–1084. (** розробка потенціометричного прототипу біосенсора для визначення афлатоксину B1*). Q1
 24. Stepurska K, Korobko M, Arkhypova V, Soldatkin O, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin A, Dzyadevych S. Identifying the inhibition type of the immobilized acetylcholinesterase by aflatoxin B1 within the potentiometric biosensor. Biopolym. Cell- 2016;32(4):271-278. (** дослідження типу інгібування ацетилхолінестерази афлатоксином B1*). Q3
 25. Nakonechnyi A, Martsenyuk V, Sverstiuk A, Arkhypova V, Dzyadevych S. Investigation of the Mathematical Model of the Biosensor for the Measurement of A-Chaconine Basing on the Impulsive Differential System. CEUR Workshop Proceedings. 2020;2762:209–217. (** участь в розробці математичної моделі потенціометричного біосенсора для визначення α -чаконіну*).

26. Dzyadevych S, Soldatkin O, Arkhypova V, Shkotova L, Pyeshkova V, Saiapina O, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin A, Elskaya A. Practical application of electrochemical enzyme biosensors. *Biopolymers and Cell*. 2022;38(2):71–92. (* узагальнення даних з практичного застосування біосенсорів на основі холінестераз). Q4
27. Arkhypova V, Soldatkin O, Moghylevska L, Konvalyuk I, Kunakh V, Dzyadevych S. Enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect transistors for assessment of total indole alkaloids content in tissue culture of *Rauwolfia serpentine*. *Electrochemical Science Advance*. 2022;2(5):1–8. <https://doi.org/10.1002/elsa.202100152>. (* розробка біосенсорів для визначення сумарного вмісту індольних алкалоїдів). Q2
28. Shkotova L, Zinchenko O, Arkhypova V, Dzyadevych S. Potentiometric enzyme biosensor modified with gold nanoparticles. *Applied Nanoscience*. 2023;13(7):5133–5138. <https://doi.org/10.1007/s13204-022-02715-z>. (*участь в експериментах по застосування золотих наночастинок при іммобілізації холінестерази) Q2
29. Arkhypova V, Soldatkin O, Soldatkin A, Dzyadevych S. Electrochemical biosensors based on enzyme inhibition effect. *Chemical Records*. 2024;24:e202300214.- <https://doi.org/10.1002/tcr.202300214>. (* узагальнення даних розробці біосенсорів на основі інгібування холінестераз) Q1
30. Soldatkin OO, Pyeshkova VM, Kucherenko IS, Velychko TP, Bakhmat VA, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Dzyadevych SV. Application of butyrylcholinesterase-based biosensor for simultaneous determination of different toxicants using inhibition and reactivation steps. *Electroanalysis*. 2024;36:e202300400. <https://doi.org/10.1002/elan.202300400>. (*участь в експериментах по реактивації активності бутирилхолінестерази). Q3

Статті у наукових фахових виданнях України категорії Б

1. Архипова ВМ, Бережецький АЛ, Шульга ОА, Шовелон Ж-М, Солдаткін ОП, Дзядевич СВ. Дослідження та оптимізація кондуктометричних перетворювачів на основі планарної технології. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2005;2:48–54. (* дослідження роботи кондуктометричних перетворювачів).
2. Кукла ОЛ, Павлюченко ОС, Голтвянський ЮВ, Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП. Сенсорні масиви на основі диференційних ІСПТ-елементів для моніторингу токсичних речовин природного та штучного походження. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2008;2:58–68. (* дослідження характеристик потенціометричних перетворювачів).
3. Архипова ВМ, Шелякіна МК, Кукла ОЛ, Назаренко ОА, Осипчук АА, Єльська ГВ. Біосенсорний аналіз глікоалкалоїдів в картоплі. *Biotechnologica Acta*. 2009;2(3):64–73. (* проведення експериментів по визначенню глікоалкалоїдів в картоплі).

4. Soy E, Pyeshkova V, Arkhylova V, Khadro B, Jaffrezic-Renault N, Sacco A, Dzyadevych S, Akata Kurc B. Potentialities of zeolites for immobilization of enzymes in conductometric biosensors. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2010;1:27–34. (** участь в експериментах з використання цеолітів при іммобілізації холінестераз*).
5. Кучеренко ІС, Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП. Кондуктометричний біосенсор на основі ацетилхолінестерази для визначення катіонних поверхнево-активних речовин в водних розчинах. *Biotechnologica Acta*. 2011;4(5):83–89. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення ПАР*).
6. Коробко МЮ, Степурська КВ, Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Дзядевич СВ. Оптимізація процедури роздільного біосенсорного визначення афлатоксинів та пестицидів. *Sensor Electronics and Microsystems Technologies*. 2016;13(4):61–72. (** участь в експериментах з розробки процедури роздільного біосенсорного визначення афлатоксинів та пестицидів*).
7. Архипова ВМ, Степурська КВ, Циганенко КВ, Савчук ЯІ, Єльська ГВ, Дзядевич СВ. Біосенсорне визначення афлатоксину В1 в сільськогосподарській продукції. *Sensor Electronics and Microsystems Technologies*. 2019;16(4):37–52. (** проведення експериментів по визначенню афлатоксину В1 в сільськогосподарській продукції*).
8. Сверстюк АС, Архипова ВМ, Степурська КВ, Марценюк ВП, Бойко ІВ, Дзядевич СВ. Розробка та верифікація математичної моделі потенціометричного біосенсору для визначення α -чаконіну. *Вісник Хмельницького національного університету*. 2020;281(1):230–237. (** участь в розробці математичної моделі потенціометричного біосенсору для визначення α -чаконіну*).
9. Солдаткін ОО, Солдаткіна ОВ, Архипова ВМ, Пилипонський ІІ, Рєзніченко ЛС, Грузіна ТГ, Дибкова СМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП. Використання наночастинок золота для покращення аналітичних характеристик кондуктометричних ферментних біосенсорів. *Sensor Electronics and Microsystems Technologies*. 2021;18(1):20–34. (** участь в експериментах з використання наночастинок золота для кондуктометричних біосенсорів*).
10. Архипова ВМ, Солдаткін ОО, Можилевська ЛП, Конвалюк ІІ, Кунах ВА, Дзядевич СВ. Розробка ферментного біосенсора на основі рН-чутливих польових транзисторів для оцінки сумарного вмісту індольних алкалоїдів в культурі тканин раувольфії зміїної (*Rauwolfia serpentina Benth. Ex Kurz*). *Sensor Electronics and Microsystems Technologies*. 2021;18(3):38–50. (** розробка біосенсорів для визначення сумарного вмісту індольних алкалоїдів*).
11. Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Кучеренко ІС, Кучеренко ДЮ, Дзядевич СВ. Адаптація процедури коіммобілізації ферментів з різними модифікаціями цеолітів на поверхню кондуктометричних перетворювачів. *Sensor Electronics and Microsystems Technologies*. 2021;18(4):11–26. (** участь в експериментах з коіммобілізації холінестераз з різними модифікаціями цеолітів*).

12. Кукла ОЛ, Павлюченко АС, Дзядевич СВ, Архипова ВМ, Жаффрезік-Рено Н. Фізична модель тимчасової нестабільності струму в іон-селективних польових транзисторах з діелектричними шарами оксиду/нітриду кремнію. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2023;20(3):79–91. (* участь в експериментах з дослідження стабільності перетворювачів).
13. Кукла ОЛ, Павлюченко АС, Архипова ВМ, Еррашид А, Дзядевич СВ. Визначення впливу температурної та УФ обробки на характеристики диференційних ІСПТ електродів. *Sensor Electronics and Microsystem Technologies*. 2023;20(4):4–18. (* участь в експериментах з дослідження впливу температури на характеристики ІСПТ електродів).

Статті в інших виданнях

1. Dzyadevych SV, Arkhylova VN, El'skaya AV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Soldatkin AP. Conductometric enzyme biosensors for substrates or inhibitors analysis. *Current Topics in Analytical Chemistry*. 2001;2:179–186. (* участь в експериментах по визначенню пестицидів).
2. Дзядевич СВ, Архипова ВМ, Мартле К, Жаффрезік-Рено Н, Солдаткін ОП, Єльська ГВ. Електрохімічні біосенсиори на основі іммобілізованих холінестераз для екологічного моніторингу. *Екологія і ноосфера*. 2004;15:5–17. (* участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення токсинів).
3. Павлюченко АС, Кукла АЛ, Голтвянский ЮВ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін АП. Исследование стабильности характеристик рН-чувствительных полевых транзисторов. *Оптоэлектроника и полупроводниковая техника*. 2010;45:90–99. (* досліджено стабільність та рН-чутливість польових транзисторів).
4. Дзядевич СВ, Архипова ВМ, Мельник ВГ, Ленков СВ. Метод експрес-аналізу нервово-паралітичних отруйних речовин з використанням кондуктометричних біосенсорів на основі холінестераз. *Сучасна спеціальна техніка*. 2011;1(24):118–124. (* участь в експериментах з розробки методу для визначення токсинів різної природи).

Патенти

1. Солдаткін ОО, Назаренко ОА, Павлюченко ОС, Кукла ОЛ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Єльська ГВ. Мультибіосенсор для визначення концентрацій токсичних речовин у водних розчинах. Патент України на корисну модель № 27284. Подано: 08.06.2007. Опубліковано: 25.10.2007; бюл. № 17. (* участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення фосфорорганічних пестицидів)
2. Солдаткін ОО, Кучеренко ІС, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП. Кондуктометричний ферментний біосенсор для визначення поверхнево-активних речовин у водних розчинах. Патент України на корисну модель №

52437. Подано: 05.03.2010. Опубліковано: 25.08.2010; бюл. № 16. (** участь в експериментах з розробки кондуктометричних біосенсорів для визначення ПАР*).

3. Архипова ВМ, Шелякіна МК, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Павлюченко ОС, Кукла ОЛ. Ферментний біосенсор для визначення аніонних поверхнево-активних речовин у водних розчинах. Патент України на корисну модель № 55939. Подано: 16.07.2010. Опубліковано: 27.12.2010; бюл. № 24. (** участь в експериментах з розробки потенціометричних біосенсорів для визначення ПАР*).
4. Степурська КВ, Архипова ВМ, Коробко МЮ, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ, Циганенко КС, Савчук ЯІ, Зайченко ОМ. Ферментний потенціометричний біосенсор для експрес-аналізу афлатоксинів у пробах зернових. Патент України на корисну модель № 106062. Подано: 12.11.2015. Опубліковано: 11.04.2016; бюл. № 7. (** розробка біосенсорів для визначення афлатоксинів у пробах зернових*).
5. Архипова ВМ, Коробко МЮ, Солдаткін ОО, Дзядевич СВ, Кунах ВА, Можилевська ЛП, Пороннік ОО. Ферментний потенціометричний біосенсор для експрес-оцінки сумарного вмісту індольних алкалоїдів в культурі тканин раувольфія зміїна. Патент України на корисну модель № 118762. Подано: 06.04.2017. Опубліковано: 28.08.2017; бюл. № 16. (** розробка біосенсорів для визначення сумарного вмісту індольних алкалоїдів*).
6. Солдаткін ОО, Пешкова ВМ, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Резніченко ЛС, Дибкова СМ. Кондуктометричний біосенсор на основі коїмобілізованої ацетилхолінестерази з наночастинками золота для інгібіторного визначення іонів важких металів у водних розчинах. Патент України на корисну модель № 148725. Подано 27.04.2021. Опубліковано: 08.09.2021; бюл. № 36. (** участь в експериментах з використання наночастинок золота для інгібіторного визначення іонів важких металів у водних розчинах*).
7. Солдаткін ОО, Архипова ВМ, Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Резніченко ЛС, Дибкова СМ. Кондуктометричний біосенсор на основі коїмобілізованої бутирилхолінестерази з наночастинками золота для інгібіторного визначення фосфорорганічних пестицидів у водних розчинах. Патент України на корисну модель № 148726. Подано 27.04.2021. Опубліковано: 08.09.2021; бюл. № 36. (** участь в експериментах з використання наночастинок золота для інгібіторного визначення фосфорорганічних пестицидів у водних розчинах*).

Методичні вказівки

1. Архипова ВМ, Степурська КВ, Дзядевич СВ. Біосенсор на основі рН-чутливих польових транзисторів для визначення глікоалкалоїдів у картоплі : методичні рекомендації до виконання лабораторної роботи. Київ: ВПЦ "Київський

університет"; 2018. 30 с. (** розробка методичних рекомендацій до виконання лабораторної роботи для визначення глікоалкалоїдів*).

Матеріали і тези доповідей наукових конференцій і з'їздів

1. Korpan Y, Arkhipova V, Nazarenko E, El'skaya A, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin A. Novel electrochemical biosensors for stearoidal glycoalkaloids detection based on butyrylcholinesterase. Book of 1st Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry; 2001 September 11-15; Odessa, Ukraine. 2001. P. 38-39. (**участь в експериментах з розробки лабораторного прототипу електрохімічного біосенсора для визначення стероїдних глікоалкалоїдів*).
2. Soldatkin AP, Dzyadevych SV, Korpan YI, Arkhipova VN, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Electrochemical microbiosensors based on cholinesterases for environmental and food toxins analysis. Proc. of Journees Maghreb-Europe "Les Materiaux et leurs Applications aux Dispositifs Capteurs. Physiques, Chimiques et Biologiques "MADICA 2001"; 2001 October 29-31; Hammamet, Tunisie. 2001. P. 29. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення токсинів різної природи*).
3. Arkhipova VN, Dzyadevych SV, Nazarenko EA, Korpan YI, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Development of potentiometric biosensors for detection of glycoalkaloids in potatoes and their application for studying the enzyme inhibition mechanisms. Proc. of Eurosensors XVI; 2002 September 15-18; Prague, Czech Republic. 2002. P. 677-678. (** участь в експериментах з дослідження механізмів інгібування холінестераз*).
4. Soldatkin AP, Arkhipova VN, Dzyadevych SV, Nazarenko EA, Korpan YI, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Development of potentiometric biosensor for detection of potato glycoalkaloids. Book of abstract of International Conference "Functionalized materials: synthesis, properties and application"; 2002 September 24-29; Kyiv, Ukraine. 2002. P. 280-281. (** розробка біосенсорів для визначення глікоалкалоїдів картоплі*).
5. Dzyadevych SV, Arkhipova VN, El'skaya AV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C, Chovelon J-M, Georgiou C, Soldatkin AP. Early-warning system in the environment based on electrochemical biosensors and enzyme inhibition effect. Proc. of 3rd Aegean Analytical Chemistry Days; 2002 September 29–October 3; Polihnitos, Lesvos, Greece. 2002. P. 425. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення пестицидів*).
6. Arkhipova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Korpan YI, El'skaya AV, Gravouelle J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Application of biosensors based on ISFETs for fast detection of total solanaceous glycoalkaloids in potatoes samples. 17th European Conference on Solid-State Transducers; 2003 September 21-24; Guimaraes, Portugal. 2003. P. 592-593. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення глікоалкалоїдів картоплі*).

7. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Chovelon J-M, Soldatkin AP. Application of conductometric enzyme biosensors for substrates or inhibitors analysis. 3rd International Conference of Instrumental Methods of Analysis; 2003 September 23-27; Thessaloniki, Greece. 2003. (* *участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення інгібіторів ферментів*).
8. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Enzyme biosensor for tomatine detection in tomatoes. International Workshop on Biosensors for Food Safety and Environmental Monitoring; 2003 October 9-11; Marrakech, Morocco. 2003. P. 32. (* *розробка біосенсорів для визначення глікоалкалоїдів томатів*).
9. El'skaya AV, Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Biosensors based on enzyme field effect transistors: 15 years of experience. 8 World Congress "Biosensors' 2004"; 2004 May 24-26; Granada, Spain. 2004. P3.7.60. (* *узагальнення даних з розробок біосенсорів на основі холінестераз*).
10. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Soldatkin AP, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, El'skaya AV. Development of enzyme biosensors based on pH-sensitive field effect transistors for tomatine determination in tomatoes. International Conference on Sensors Electronics and Microsystem technology; 2004 June 1-5; Odessa, Ukraine. 2004. P. 217. (* *розробка біосенсорів для визначення глікоалкалоїдів томатів*).
11. Arkhypova VN, Dzyadevych SV, Nazarenko EA, Soldatkin AP, El'skaya AV, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Cholinesterase-based biosensor for glycoalkaloids analysis in potatoes and tomatoes. VIIIth International Meeting on Cholinesterases; 2004 September 26-30; Perugia, Italy. 2004. P. 9. (* *розробка біосенсорів для визначення глікоалкалоїдів картоплі і томатів*).
12. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, El'skaya AV, Chovelon J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin AP. Cholinesterases-based potentiometric biosensors. MADICA 2004; 2004 November 29–December 1; Tunise, Tunis. 2004. P. 137. (* *узагальнення даних з розробок потенціометричних біосенсорів на основі холінестераз*).
13. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Soldatkin AP, Chovelon J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N. Electrochemical enzyme biosensors based on cholinesterases. Second International Symposium on Intelligent Artifacts and Bio-systems; 2005 January 27-28; Lyon, France. 2005. P. 61. (* *узагальнення даних з розробок кондуктометричних біосенсорів на основі холінестераз*).
14. Gravouelle J-M, Soldatkin AP, Arkhypova VN, Dzyadevych SV, El'skaya AV, Jaffrezic-Renault N, Martelet C. Analysis of the potato glycoalkalids by using of enzyme biosensor based on pH-ISFETs: a rapid method. 16th Triennial Conference of the European Association for potato research; 2005 July 17-22; Bilbao, Spain. 2005. (* *проведення експериментів по визначенню глікоалкалоїдів в картоплі*).
15. Архипова ВН, Мартле К, Жаффрезик-Рено Н, Солдаткин АП. Биосенсоры на основе иммобилизированных холинестераз. 2-а Міжнародна науково-технічна конференція „Сенсорная електроніка та мікросистемні технології”; 26-30

- червня 2006 р.; Одеса, Україна. 2006. С. 187. (** узагальнення даних з розробок біосенсорів на основі холінестераз*).
16. Dzyadevych SV, Arkhypova VN, Chovelon J-M, Martelet C, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin AP. Electrochemical biosensors based on cholinesterases. Ukrainian-German Symposium on Nanobiotechnology; 2006 December 14-16; Kyiv, Ukraine. 2006. P. 52. (** узагальнення даних з розробок кондуктометричних біосенсорів на основі ацетилхолінестерази*).
 17. Дзядевич СВ, Солдаткін ОП, Архипова ВМ, Кукла ОЛ, Єльська ГВ. Ферментні біосенсиори на основі іон-селективних польових транзисторі. 4-а Міжнародна науково-технічна конференція „Сенсорна електроніка та мікросистемні технології”; 28 червня - 2 липня 2010 р.; Одеса, Україна. 2010. С.12-13. (** узагальнення даних з розробок біосенсорів на основі холінестераз та іон-селективних польових транзисторів*).
 18. Кучеренко ІС, Солдаткін ОО, Шелякіна МК, Архипова ВМ, Дзядевич СВ. Розробка кондуктометричного біосенсора на основі ацетилхолін естерази для визначення поверхнево-активних речовин в водних розчинах. III міжнародна наукова конференція “Фізичні методи в екології, біології та медицині”; 9-12 вересня 2010 р.; Львів-Шацьк, Україна. 2010. С. 61-63. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення ПАР*).
 19. Soldatkin OO, Kucherenko IS, Arkhypova VM, Dzyadevych SV, Soldatkin AP. Enzyme-based sensor for surfactant determination. International Conference “Functional Materials”; 2011 October 3-8; Partenit, Crimea, Ukraine. 2011. P. 388. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення ПАР*).
 20. Stepurska KV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Kirdeciler SK, Galioglu S, Akata B, Lagarde F, Dzyadevych SV. The application of the nanosized zeolites for optimization of the acetylcholinesterase based biosensors for determination of the aflatoxin B1. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials”; 2014 August 23-30; Yaremche-Lviv, Ukraine. 2014. P. 61. (** участь в експериментах з використання цеолітів при іммобілізації холінестераз*).
 21. Stepurska K, Soldatkin OO, Arkhypova V, Soldatkin AP, Lagarde F, Jaffrezic-Renault N, Dzyadevych S. Potentiometric biosensor based on acetylcholinesterase for the inhibitory analysis of aflatoxin B1 in real samples. 6 International scientific and technical conference “Sensor electronics and microsystems technologies”; 2014 September 29 - October 3; Odessa, Ukraine. 2014. P. 81. (** проведення експериментів по визначенню афлатоксину B1 в сільськогосподарській продукції*).
 22. Stepurska KV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Jaffrezic-Renault N, Lagarde F, Dzyadevych SV. Novel acetylcholinesterase biosensor for aflatoxin B1 determination. EMRS 2015 Spring Meeting; 2015 May 11-15; Lille, France. 2015. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення афлатоксинів*).
 23. Stepurska KV, Soldatkin OO, Arkhypova VM, Soldatkin AP, Jaffrezic-Renault N, Lagarde F, Dzyadevych SV. Enzyme biosensor based on pH-sensitive field-effect

transistors for aflatoxin B1 analysis in real samples. Journee de Printemps de la SCF en Rhone Alpes; 2015 Juin 11; Villeurbanne, France. 2015. P. 51. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення афлатоксинів в реальних зразках*).

24. Stepurska KV, Arkhypova VM, Soldatkin OO, Jaffrezic-Renault N, Lagarde F, Dzyadevych SV Application of potentiometric biosensor based on acetyl cholinesterase for detection of aflatoxin B1. International Porous and Powder Materials Symposium and Exhibition PPM 2015; 2015 September 15-18; Cesme Izmir, Turkey. 2015. P. 25. (** участь в експериментах з застосування біосенсорів для визначення афлатоксинів*).
25. Stepurska K, Korobko M, Arkhypova V, Soldatkin O, Soldatkin A, Lagarde F, Dzyadevych S. Application of a potentiometric biosensor based on acetylcholinesterase inhibition for the determination of toxic compound of different types. Vème Journée Rhône-Alpes des Biomolécules; 2016 Juin 7; Villeurbanne, France. 2016. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення токсичних компонент різної природи*).
26. Архипова ВМ, Циганенко КВ, Дзядевич СВ. Біосенсорне визначення афлатоксину В1 у зразкаї зернових. XII Український біохімічний конгрес; 30 вересня-4 жовтня 2019 р; Тернопіль, Україна. Медична та клінічна хімія. 2019; 21(3):260. (** участь в експериментах з розробки біосенсорів для визначення афлатоксинів у зразках зернових*).
27. Soldatkin OO, Soy E, Arkhypova V, Pyeshkova V, Akata B, Soldatkin AP, Dzyadevych S. Using zeolites for improvement of performance of biosensor based on ISFET for inhibitory determination of toxic compoinds. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2021)”; 2021 August 25-27; Lviv, Ukraine. 2021. P.259. (** участь в експериментах з коїммобілізації холінестераз з різними модифікаціями цеолітів*).
28. Shkotova LV, Zinchenko OA, Arkhypova VM, Dzyadevych SV. Potentiomentric enzyme biosensor modified with gold nanoparticles. International research and practice conference “Nanotechnology and nanomaterials (NANO-2021)”; 2021 August 25-27; Lviv, Ukraine. 2021. (** участь в експериментах з коїммобілізації холінестераз з різними золотими наночастинками*).
29. Dzyadevych S, Soldatkin O, Arkhypova V, Shkotova L, Pyeshkova V, Saiapina O, Jaffrezic-Renault N, Soldatkin A, Elskaya A. Electrochemical enzyme biosensors and their practical application. Deuxièmes Rencontres Capteurs de l’Université Bourgogne Franche-Comté; 2022 Novembre 24-25; Dijon, France. 2022. P. 26. (** участь в експериментах по визначенню глікоалкалоїдів в картоплі та афлатоксинів в зернових*).
30. Архипова ВМ, Солдаткін ОО, Жаффрезік-Рено Н, Солдаткін ОП, Дзядевич СВ. Ензимні біосенсиори на основі ефекту інгібування. IX з’їзд Українського біофізичного товариства; 30 жовтня - 2 листопада 2023 р.; Київ, Україна. 2023. С. 153-154. (** узагальнення даних розробці біосенсорів на основі інгібування холінестераз*)

АНОТАЦІЯ

Архипова В. М. Фундаментальні та біотехнологічні основи застосування холінестераз в біосенсорах. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – Біотехнологія (091 – Біологія та біохімія). Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ, 2025.

Дисертація присвячена розробці фундаментальних та біотехнологічних основ застосування холінестераз в електрохімічних біосенсорах для практичного застосування в сільському господарстві та екологічному моніторингу.

Вперше проаналізовано, систематизовано та розроблено низку електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз з використанням різних типів електрохімічних перетворювачів, процедури іммобілізації ензимів та методик вимірювань, що дозволило отримати обґрунтовані фундаментальні результати і розробити біотехнологічні основи застосування холінестераз в біосенсорах і перевірити їх ефективність для подальшої практичної роботи з реальними зразками довкілля та сільськогосподарської продукції.

Розроблено ряд електрохімічних біосенсорів на основі ензимів ацетил- та бутирилхолінестераза з використанням процесу інгібування їхньої активності, детально досліджено їхні аналітичні характеристики. Базуючись на цих дослідженнях, створено низку діючих лабораторних прототипів для визначення концентрацій фосфорорганічних та карбаматних пестицидів, глікоалкалоїдів та індольних алкалоїдів, деяких поверхнево активних речовин та афлатоксинів, які оптимізовано для подальшої роботи з реальними зразками. Для частини отриманих біосенсорів проведено метрологічні дослідження, зокрема розроблено стандартизовані методики визначення, які затверджені в ДП «Укрметртестстандарт».

За допомогою розроблених біосенсорів проведено кількісний аналіз глікоалкалоїдів в клубнях більш як 60 різних сортів картоплі та томатів, аналіз афлатоксинів в зразках пшениці, сої, кукурудзи та проса, спеціально інфікованих мікроскопічними грибами *Aspergillus flavus* та *Aspergillus ochraceus*. Вперше розроблено та оптимізовано процедуру селективного аналізу мультикомпонентних зразків, в складі яких є як афлатоксини, так і пестициди.

Створені лабораторні прототипи електрохімічних біосенсорів на основі холінестераз можуть в подальшому бути основою комерційних пристроїв для експресного аналізу токсичних речовин різної природи, що можуть вироблятися як в Україні, так і за кордоном.

Ключові слова: аналітична біотехнологія, ензими, електрохімічні біосенсиори, холінестерази, кондуктометричні датчики, рН-чутливі польові транзистори, наночастинки, інгібітори, екологічний моніторинг, експрес-аналіз, математичне моделювання.

Summary

Arkhypova V. M. Fundamental and biotechnological bases of the application of cholinesterases in biosensors. – Qualifying scientific work in the form of manuscript.

Thesis for Doctor of Sciences degree in Biology (specialty 03.00.20 "Biotechnology" (091 – Biology and Biochemistry). Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, D.K. Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2025.

The dissertation is devoted to the development of fundamental and biotechnological bases of the application of cholinesterases in electrochemical biosensors for practical uses in agriculture and environmental monitoring.

For the first time, a number of electrochemical biosensors based on cholinesterases were analyzed, systematized and developed using various types of electrochemical transducers, enzyme immobilization procedures and measurement techniques, which allowed obtaining substantiated fundamental results and developing biotechnological bases for the application of cholinesterases in biosensors and checking their effectiveness for further practical work with real samples of the environment and agricultural products.

A number of electrochemical biosensors based on acetyl- and butyrylcholinesterase enzymes were developed using the process of inhibiting their activity, and their analytical characteristics were studied in detail. Based on these studies, a number of operating laboratory prototypes were created to determine the concentrations of organophosphorous and carbamate pesticides, glycoalkaloids and indole alkaloids, some surfactants and aflatoxins, which were optimized for further work with real samples. For some of the obtained biosensors, a number of metrological studies were performed, which were approved by the State Enterprise "Ukrmetrteststandart".

Using the developed biosensors, a quantitative analysis of glycoalkaloids in tubers of more than 60 different varieties of potatoes and tomatoes was carried out, and aflatoxins were analyzed in samples of wheat, soybeans, corn and millet, specially infected with mold fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus ochraceus*. For the first time, a procedure for selective analysis of multicomponent samples containing both aflatoxins and pesticides was developed and optimized.

The created laboratory prototypes of electrochemical biosensors based on cholinesterases could be the basis of commercial devices for rapid analysis of toxic substances of various nature, which can be produced both in Ukraine and abroad.

Keywords: analytical biotechnology, enzymes, electrochemical biosensors, cholinesterases, conductometric transducers, pH-sensitive field-effect transistors, nanoparticles, inhibitors, environmental monitoring, rapid analysis, mathematical modeling.