



ДЗЯДЕВИЧ

Сергій Вікторович — член-кореспондент НАН України, заступник директора з наукової роботи Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

БІОСЕНСОРИКА — СУЧАСНИЙ НАПРЯМ АНАЛІТИЧНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ

**Стенограма доповіді на засіданні
Президії НАН України 30 листопада 2022 року**

У доповіді наведено результати досліджень, що проводяться в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України в галузі біосенсорики. Роботи за цим напрямом сконцентровані на вивченні фізико-хімічних та біохімічних процесів у біомембранах та електрохімічній коміріці, розробленні теоретичних і технологічних засад аналітичного використання ензимів для створення біосенсорів, застосуванні сучасних електрохімічних методів та математичних підходів до дослідження складних біофізичних систем. Розроблено різні типи біосенсорів, які є вкрай необхідними для аналітичної практики та експресного аналізу в медицині, екології, хімічній та фармацевтичній промисловості тощо.

Шановний Анатолію Глібовичу!

Шановні присутні!

Біосенсорика — це сучасна галузь біотехнології, яка розвивається на стику багатьох наук: біології, фізики, хімії, математики, інформатики, матеріалознавства, радіотехніки, електроніки, поєднує їх знання і дає яскраві приклади того, як високі технології втілюються в життя.

Згідно з визначенням Міжнародного союзу теоретичної та прикладної хімії (IUPAC), біосенсором називають автономний інтегральний аналітичний пристрій, який забезпечує кількісний чи напівкількісний аналіз з використанням біологічного розпізнавального елемента, що перебуває в безпосередньому контакті з фізичним перетворювачем. Біологічний елемент розпізнає відповідні речовини-аналіти, які потрібно детектувати, а фізичний перетворювач відповідає за перетворення біохімічного сигналу в електричний, який можна легко зареєструвати і обробити.

Серед переваг біосенсорів порівняно з класичними методами вимірювання різноманітних біохімічних параметрів слід відзначити їх високу чутливість і селективність; швидкість аналізу та відсутність необхідності попередньої підготовки проби; просто-

ту використання; широкий діапазон речовин, які можна детектувати; здатність до мініатюризації і високого рівня інтеграції; можливість створення мультисенсорів; придатність до використання в польових умовах; низьку собівартість у разі масового виробництва.

Тому не дивно, що сфера застосування біосенсорів дуже широка і охоплює практично всі галузі, що забезпечують життєдіяльність суспільства. Це медична діагностика (лабораторні аналізи, контроль інтенсивної терапії, аналізи у домашніх умовах тощо), моніторинг довкілля (визначення вмісту хімічних сполук, моніторинг якості води, повітря, аналіз токсичних і мутагенних матеріалів), біотехнології (контроль процесу ферментації, визначення кінцевих продуктів ферментації тощо), системи безпеки (криміналістика, детектування наркотичних, вибухових речовин), харчова промисловість (контроль виробництва, якості, концентрацій тих чи інших речовин, свіжості продукції), індустриальне виробництво, сільське господарство, військова галузь.

Аналіз світових фінансових інвестицій у розроблення біосенсорів свідчить про сталу позитивну динаміку розвитку цієї галузі. Так, у 1996 р. обсяг капіталовкладень у розвиток біосенсорики становив 500 млн дол. США, у 2000 р. — 3 млрд, у 2010 р. — 8,5 млрд, у 2018 р. — 16,8 млрд, а в 2021 р. — 25,1 млрд дол. США. За прогнозами міжнародних експертів, очікується, що до 2028 р. світовий ринок біосенсорів зросте до 38 млрд дол. США.

Далі я дуже стисло розповім, які дослідження в галузі біосенсорики проводяться в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України.

Насамперед ми вивчаємо фізико-хімічні процеси, що відбуваються в біомембранах та електрохімічній комірі. Нами було запропоновано моделювання цих процесів з використанням еквівалентних електричних схем. Так, при дослідженні процесів у біомембрані ми вперше застосували метод імпедансної спектроскопії, що дозволило глибше зрозуміти перебіг фізико-хімічних процесів в ензимній мембрані, правильно підібрати якнайкращі перетворювачі. Крім

того, цей метод уможливив цілеспрямований пошук шляхів поліпшення основних аналітичних характеристик біосенсорів.

Було вирішено проблему нанесення різних ензимів на один мультисенсорний чип, коли кожна мембрана містить відповідний ензим чи суміш ензимів, які можуть функціонувати одночасно в одному середовищі. На прикладі створеного нами мультибіосенсора для селективного визначення різних цукрів, таких як лактоза, мальтоза, сахароза та глюкоза (рис. 1), добре видно, що в разі додавання в середовище якоїсь одної з цих речовин спрацьовує лише той датчик, який є селективним до неї: глюкозний сенсор — фермент глюкозооксидаза; лактозний сенсор — суміш ферментів β -галактозидаза-мутаротаза-глюкозооксидаза; сахарозний сенсор — суміш ферментів інвертаза-мутаротаза-глюкозооксидаза; мальтозний сенсор — суміш ферментів α -глюкозидаза-мутаротаза-глюкозооксидаза.

З метою оптимізації аналітичних характеристик біосенсорів ми продемонстрували можливість використання додаткових штучних полімерних мембран для підвищення чутливості та селективності основної ензимної мембрани. Крім того, нанесення додаткових мембран дозволило створити дифузійний бар'єр і зменшити вплив на величину відгуку інтерферуючих речовин. На рис. 2 показано, як змінюється чутливість біосенсора для визначення сечовини в разі застосування додаткової мембрани.

Останнім часом велику увагу в наших дослідженнях ми приділяємо застосуванню наноматеріалів різної природи для надчутливого визначення біологічних речовин. Завдяки унікальним оптичним, електронним, хімічним і механічним властивостям цих матеріалів вдалося досягти значного підвищення чутливості біосенсорів, відтворюваності їхніх аналітичних характеристик під час виробництва, стабільності таких систем при зберіганні та функціонуванні, поліпшення адгезії біоматеріалу до поверхні перетворювача. Так, було показано, що застосування наночастинок природного целюліту кліноптилоліту приводить до поліп-

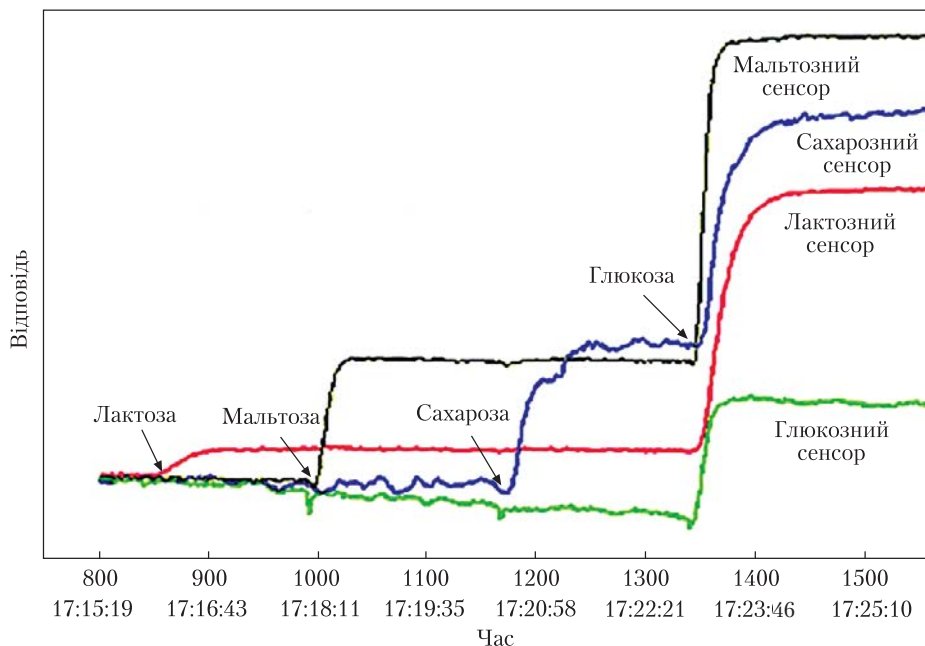


Рис. 1. Мультибіосенсор для одночасного селективного визначення різних цукрів

шення аналітичних характеристик уреазного біосенсора (рис. 3).

Досліджено біохімічні параметри та розроблено математичну модель ензиматичних процесів у біосенсорах, яка дає хороший збіг розрахованих величин параметрів з експериментальними даними. Отримані результати є особливо актуальними для роботи з високовартісними біологічними матеріалами або токсичними речовинами під час розроблення нових біосенсорів.

За результатами проведених досліджень в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України у співпраці з колегами з інших академічних установ розроблено близько 50 різних лабораторних прототипів біосенсорів з використанням іммобілізованих ензимів. Умовно їх можна поділити на такі категорії:

- для медичної діагностики — сечовина (уреаза), глюкоза (глюкозооксидаза), лактат (лактатоксидаза), ацетилхолін (ацетилхолінестераза), холін (холінооксидаза), глутамат (глутаматоксидаза), креатинін (креатиніндеіміназа), піруват (піруватоксидаза);

- для моніторингу довкілля — іони важких металів (уреаза), органофосфорні пестициди (холінестерази), хлорофенол (тирозиназа),

- формальдегід (алкогольоксидаза), карбаматні гербіциди (холінестерази), гіпохлорит (холінестерази), загальна токсичність (холінестерази), поверхнево активні речовини (ацетилхолінестераза);

- для біотехнологій — глюкоза (глюкозооксидаза), формальдегід (алкогольоксидаза), гліцерин (гліцеролоксидаза), етанол (алкогольоксидаза), метанол (алкогольоксидаза), молочна кислота (лактатоксидаза), пеніцилін (пеніциліназа);

- для харчової промисловості — глюкоза (глюкозооксидаза), аргінін (аргіназа), етанол, метанол (алкогольоксидаза), молочна кислота (лактатоксидаза), лактоза (β -галактозидаза-мутаротаза-глюкозооксидаза), сахароза (інвертаза-мутаротаза-глюкозооксидаза), мальтоза (α -глюкозидаза-мутаротаза-глюкозооксидаза), фруктоза (фруктозодегідрогеназа), глікоалкалоїди (бутирилхолінестераза), афлатоксини (ацетилхолінестераза), патулін (уреаза).

У співпраці з Інститутом фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України розроблено потенціометричний ензимний біосенсор для визначення в сільськогосподарських культурах (картопля, томати, баклажани) глікоалкалоїдів, які є натуральними токси-

нами. Нам вдалося досягти високої відтворюваності отриманих результатів та операційної стабільності біосенсора. Одним біосенсором можна провести від 500 до 1000 вимірювань протягом 2–3 місяців. При цьому падіння рівня сигналу становило близько 1 % за добу. Порівняння з контрольним традиційним методом HPLC засвідчило дуже високу кореляцію отриманих результатів ($R = 0,93$), але на одне вимірювання методом HPLC потрібно 10–24 год, тоді як час проведення аналізу за допомогою біосенсора становить 15 хв.

Разом з науковцями Інституту фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України розроблено також ензимний мультибіосенсор на основі рН-чутливих польових транзисторів для одночасного визначення глюкози, сечовини та креатиніну в сироватці та діалізаті крові людини.

Спільно з колегами з Інституту електродинаміки НАН України створено мультиферментну амперометричну біосенсорну систему для одночасного аналізу концентрацій АТФ, глюкози та активності креатинкінази, що дуже важливо для медичної діагностики. Порівняння даних, отриманих у зразках сироватки крові за допомогою біосенсорної системи та контрольному методу аналізу, показало високу кореляцію: для глюкози – 0,975, для АТФ – 0,912, для креатинкінази – 0,886.

Інша наша спільна розробка з Інститутом фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України – це портативний прилад-сигналізатор на основі масиву ферментних рН-чутливих польових транзисторів для оперативного визначення загальної токсичності.

Разом з Інститутом кібернетики імені В.М. Глушкова НАН України, Інститутом біології клітини НАН України та Інститутом електродинаміки НАН України розроблено амперометричний ензимний мультибіосенсор для аналізу якості вина та винопродуктів у виноробстві з визначенням у них концентрацій глюкози, етанолу, лактату та гліцеролу.

Кондуктометричний ензимний біосенсор для одночасного визначення лактози, мальтози, сахарози та глюкози у харчових продуктах

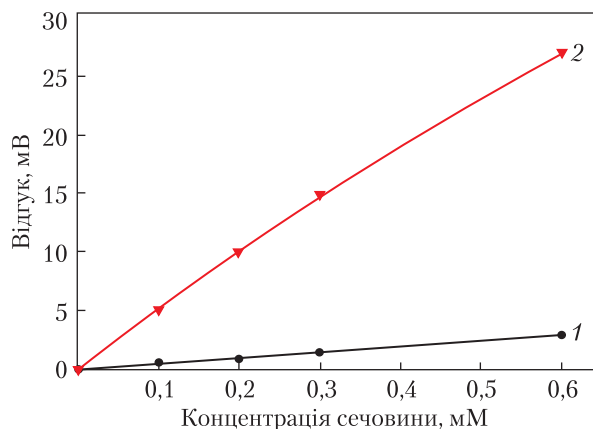


Рис. 2. Чутливість біосенсора для визначення сечовини: 1 – без додаткової мембрани; 2 – із застосуванням додаткової мембрани

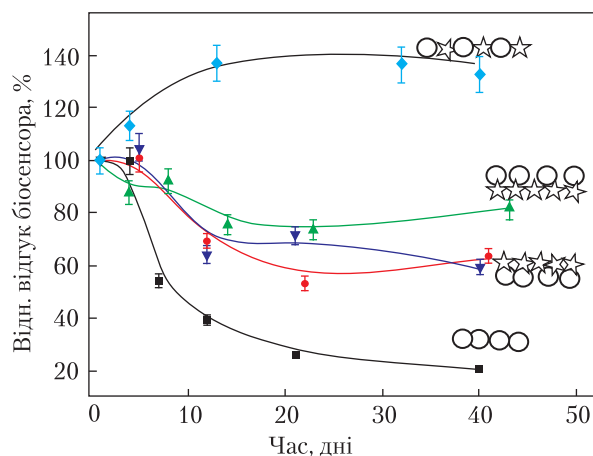


Рис. 3. Підвищення чутливості і стабільності роботи уреазного біосенсора: ○ – уреаза; ☆ – кліноптилоліт

було створено у співпраці з Інститутом електродинаміки НАН України. Найменша границя визначення субстратів становить від 1 мкМ, час відгуку – 1–2 хв.

Роботи з розроблення кондуктометричного біосенсора для визначення аргініну в продуктах харчування та дієтичних добавках на основі природної сировини проводилися спільно з Інститутом органічної хімії НАН України, Інститутом біології клітини НАН України та Інститутом електродинаміки НАН України. Як

чутливі елементи в цьому біосенсорі використовували як ензими, так і каліксарени. Прилад має високу чутливість і хорошу селективність до аргініну, засвідчено також високу кореляцію даних з визначення L-аргініну порівняно з контрольним методом аналізу ($R = 0,959$).

Ферментний біосенсор для інгібіторного визначення афлатоксинів було створено разом з колегами з Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Інституту фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова НАН України та Інституту електродинаміки НАН України. Афлатоксини — це токсичні речовини, які утворюються в зернових продуктах при зараженні їх цвіллю.

Слід наголосити, що для всіх експериментальних зразків розроблених нами приладів у тісному контакті з ДП «Укрметртестстандарт» постійно виконуються також метрологічні дослідження.

Дуже коротко зупинюся на найголовніших тенденціях подальшого розвитку біосенсорних технологій у світі, в руслі яких ми намагаємося перебувати. Це такі напрями:

- розширення спектру аналітів та розроблення мультисенсорів і сенсорних масивів, у тому числі математичного апарату аналізу масивів даних;
- розроблення ДНК-сенсорів, що уможливорює експресний аналіз генетичних і ракових захворювань, визначення мікробних та вірусних інфекцій;

- створення нових технологій синтезу надмолекулярних структур (біоміметиків), що імітують активність біологічних молекул, проте відрізняються від них більшою стабільністю та можливістю використання в агресивних середовищах;

- розроблення «розумних» біосенсорних систем із заданими аналітичними характеристиками з використанням різноманітних наноматеріалів, рекомбінантних біоселективних молекул, біоміметиків та ін.;

- створення сенсорів, що можуть функціонувати безпосередньо в живому організмі протягом тривалого часу, та поєднання їх з мікросистемами автоматичного введення ліків;

- розроблення нанобіосенсорів.

Роботи, про які йшлося в доповіді, виконуються за фінансової підтримки НАН України (проекти цільової програми наукових досліджень «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій»), Національного фонду досліджень України (2 проекти), ЄС (2 проекти за програмою Horizon). Раніше ми виконували 2 проекти за державним замовленням, що фінансувалися Міністерством освіти і науки України, та 2 проекти, профінансовані ЄС у межах 7-ї рамкової програми.

Дякую за увагу!

За матеріалами засідання підготувала О.О. Мележик

Sergei V. Dzyadevych

Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2915-716X>

BIOSENSORICS – A MODERN DIRECTION OF ANALYTICAL BIOTECHNOLOGY

Transcript of scientific report at the meeting of the Presidium of NAS of Ukraine, November 30, 2022

The report presents the results of research conducted at the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine in the field of biosensors. Work in this direction is focused on the study of physicochemical and biochemical processes in biomembranes and electrochemical cells, the development of theoretical and technological principles for the analytical use of enzymes for the creation of biosensors, the application of modern electrochemical methods and mathematical approaches to the study of complex biophysical systems. Various types of biosensors have been developed, which are essential for analytical practice and rapid analysis in medicine, ecology, chemical and pharmaceutical industry, etc.

Cite this article: Dzyadevych S.V. Biosensorics — a modern direction of analytical biotechnology. *Visn. Nac. Akad. Nauk Ukr.* 2023. (2): 50–54. <https://doi.org/10.15407/visn2023.02.050>