

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

СТАСЮК НАТАЛІЯ ЄВГЕНІВНА



УДК 579.2+577+543.6+543.9+544.6+544.7

**МІКРОБНІ ЕНЗИМИ У ПОЄДНАННІ З НАНОЗИМАМИ ДЛЯ СТВОРЕННЯ
БІО(ХЕМО)СЕНСОРІВ ТА ТЕСТ-НАБОРІВ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ПРАКТИЧНО
ВАЖЛИВИХ АНАЛІТІВ**

03.00.07 – мікробіологія

Реферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора біологічних наук

Львів – 2023

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах наукової доповіді за сукупністю статей.
Роботу виконано у відділі аналітичної біотехнології Інституту біології клітини Національної академії наук України

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України

Іваниця Володимир Олексійович

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
проректор з наукової роботи, професор кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Солдаткін Олександр Олексійович

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
провідний науковий співробітник відділу біомолекулярної електроніки

доктор біологічних наук, професор

Осташ Богдан Омелянович

Львівський національний університет імені Івана Франка,
головний науковий співробітник кафедри генетики та біотехнології,
професор кафедри генетики та біотехнології

Захист відбудеться «17» січня 2024 р. о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д35.246.01 Інституту біології клітини НАН України за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16. Тел: (032) 261 21 44

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біології клітини НАН України за адресою: 79005, м. Львів, вул. Драгоманова, 14/16 та на сайті <http://www.cellbiol.lviv.ua/index.php?do=cat&category=ukr-council>

Автореферат розіслано «9» грудня 2023 р.

Учений секретар спеціалізованої вченої ради,
к.б.н., н.с.



Н.С. Фінюк

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Сучасна медична діагностика, дослідження в галузі екологічної безпеки навколишнього середовища та безпеки харчових продуктів значною мірою базуються на використанні компонентів та властивостей молекулярного рівня організації живого. Такі актуальні проблеми, як контроль якості питної води та харчових ресурсів, створення надійних та експресних методів діагностики і лікування, часто не можуть бути вирішені традиційними підходами. Існує гостра необхідність у розробці й впровадженні принципово нових методів та технологій, які ґрунтуються на високоспецифічних ензимах, отриманих із традиційних мікробних джерел або рекомбінантних мікроорганізмів.

На сьогодні, одним із досягнень прикладної мікробіології є покращення як існуючих продуцентів біологічно активних сполук, так і конструювання нових генетично модифікованих штамів, здатних до надсинтезу цільових продуктів. Поєднання досягнень у сфері мікробіології, біохімії, генетики, ензимології, біотехнології та мікроелектроніки привело до створення нового класу аналітичних систем — біологічних сенсорів, в яких у ролі біоселективного елемента використовують ензими або генетично-модифіковані організми [Turner, 2013, doi: 10.1039/C3CS35528D; Soldatkin *et al.*, 2013, doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000819>; Gonchar *et al.*, 1998, doi: 10.1016/s0956-5663(98)00034-7; Gonchar *et al.*, 2002, doi: 10.1016/S1567-1356(02)00124-1; Корпан *та ін.*, 1995, doi: <http://dx.doi.org/10.7124/bc.0003DC>]. Головними перевагами біосенсорних підходів є їхня висока чутливість, селективність, експресність, можливість проведення масштабних досліджень навіть у польових умовах та порівняно невисока вартість аналізу загалом [Marrazza, 2022, <https://doi.org/10.3390/bios13030407>].

Сучасна аналітична біотехнологія використовує різноманітні системи біорозпізнавання, створені природою: ензим - субстрат (кофактор, ефектор - активатор або інгібітор), гормон - рецептор, антиген - антитіло, комплементарні взаємодії нуклеїнових кислот, комплекси, що беруть участь у регуляції експресії генів, сигнальні каскадні комплекси [Ouyang *et al.* 2022, <https://doi.org/10.1002/adma.202210885>]. В останні роки штучні біоміметики – аптамери, абзими, нанозими – також використовуються в ролі біоаналітичних інструментів [Chadha *et al.*, 2022, <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2022.02.010>].

До складу біоселективного шару біосенсорів найчастіше входять ензими. Вони каталізують біохімічні реакції і специфічно зв'язуються зі своїми субстратами. Ензими давно стали незамінним інструментом у багатьох хімічних та біотехнологічних процесах, які широко використовуються у харчовій промисловості, сільському господарстві та медицині [Dzyadevych *et al.*, 2022 <http://dx.doi.org/10.7124/bc.000A76>; Smutok & Katz, 2023 <https://doi.org/10.3390/bios13010044>]. Вони характеризуються високою селективністю та надзвичайно високою каталітичною активністю. Однак природні ензими здебільшого мають обмежену хімічну та біологічну стабільність, а також високу вартість через складні технології, що застосовуються для їхнього виділення та очищення з біологічних джерел. Хоча сучасна прикладна мікробіологія та генетична

інженерія значно полегшують ці процедури, отримання високоочищених ензимів у комерційних кількостях все ще залишається ключовим викликом для практичної ензимології. На сьогодні, перспективним підходом щодо розробки електрохімічних біосенсорів є встановлення прямої електронної комунікації між біомолекулами та поверхнею електрода. Це дозволяє створити біосенсиори «третього покоління» на основі оксидоредуктаз або їх штучних аналогів – нанозимів.

Нанозими – це найновіший клас функціональних наноматеріалів [Peixia, 2020, doi: 10.3389/fbioe.2020.00015; Niu *et al.*, 2022, <https://doi.org/10.3390/bios12040251>], які мають ензимоподібну активність. Порівняно з природними ензимами, нанозими володіють підвищеною стабільністю та більшою доступністю завдяки відносно простим технологіям синтезу. Важлива перевага нанозимів – залежність їхньої активності від розміру/складу наночастинок. Це дозволяє створювати нові матеріали з широким діапазоном каталітичної активності, просто змінюючи форму, структуру та склад наночастинок. Нанозими (НЗ) також мають унікальні властивості, порівнюючи з іншими штучними ензимами, зокрема велику питому площу поверхні, що значно полегшує їхню подальшу модифікацію та біокон'югацію [Wang & Gunasekaran, 2020, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115841>]. Здатність наноматеріалів до спонтанної структурної самоорганізації також є дуже важливою характеристикою для біології та медицини завдяки легшому включенню біологічних компонентів у структуру наноматеріалу.

Завдяки своїй каталітичній активності НЗ можуть застосовуватися в наукових дослідженнях, біотехнології та харчовій промисловості, сільському господарстві, для деградації забруднювачів навколишнього середовища (очищення стічних вод, деградація хімічних бойових речовин), а також у клінічній діагностиці та фармакології [Kurup & Ahmed, 2023, <https://doi.org/10.3390/bios13040461>]. Крім їхнього використання як діагностичних засобів, нанозими є перспективними каталітичними компонентами терапевтичних препаратів [Thangudu & Su, 2021, <https://doi.org/10.3390/biom11071015>]. Завдяки біосумісності та магнітним властивостям деяких нанозимів, їх можна використовувати для локального цілеспрямованого лікування злоякісних утворень. Нанозими можуть слугувати антиоксидантами при лікуванні аутоімунних захворювань, хвороб Альцгеймера та Паркінсона, а також застосовуватись як антибактерійні засоби. Із відкриттям НЗ як штучних ензимів [Ren *et al.*, 2022 <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01295-y>; Wei *et al.*, 2023 <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101269>], стало можливим використання явища прямого електронного перенесення при створенні нанозимних біосенсорів, а також для забезпечення вимог щодо їхньої високої каталітичної активності, хімічної та біологічної стабільності, розміру.

Отже, прості методи синтезу НЗ, їхні унікальні каталітичні властивості, а також здатність до специфічного зв'язування з багатьма біологічними молекулами робить їх привабливими об'єктами для досліджень у біосенсорних технологіях. Зважаючи на актуальність вищезгаданих проблем, основну увагу в дисертаційній роботі приділено синтезу нових наноматеріалів із каталітичною активністю, а саме, штучних ензимів – нанозимів; дослідженню структурних, фізико-хімічних та каталітичних властивостей НЗ у поєднанні їх з мікробними ензимами; вивченню біологічної та можливої токсичної дії (*in vivo*) нанозимних композитів на клітині

дріжджів *Ogataea (Hansenula) polymorpha*; кон'югації наноматеріалів з мікробними ензимами та створення на їхній основі нових біоаналітичних методів – біонаносенсорних та нанозимно-ензиматичних.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота є результатом досліджень, які проведено автором на базі відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України, в якому одним із напрямків досліджень є розробка ензиматичних та біосенсорних методів аналізу практично важливих сполук у біологічних рідинах, харчових продуктах та об'єктах навколишнього середовища. Дисертаційна робота відповідає основному плану науково-дослідних робіт відділу і виконувалася в рамках бюджетних тем: “Розробка нових біоаналітичних методів визначення вмісту L- і D-лактату та L-аргініну для діагностики деяких захворювань, контролю їх перебігу” (№ держреєстрації 0113U000142, 2013-2015 рр.), “Створення нових біосенсорних та ензиматичних методів визначення вмісту креатиніну як біомаркера функціонального стану нирок та контролю процесу гемодіалізу” (№ держреєстрації 0116U002208, 2016-2018 рр.), «Нанозими і наномедіатори: пошук, синтез, характеристика та використання для біосенсорного та ензиматичного аналізу на основі мікробних оксидоредуктаз» (№ держреєстрації 0119U001418, 2019-2021 рр.), комплексної науково-технічної програми фундаментальних досліджень НАН України у 2015 р. «Розробка, тестування та випуск пробної серії ензиматичного набору “Аргітест” для аналізу аргініну в клінічних зразках. Розділ 1. Оптимізація складу набору, умов проведення аналізу та розробка науково-технічної документації» (проект 29-2015), цільової програми наукових досліджень НАН України у 2013-2017 рр. “Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація” (№ держреєстрації 0112U002963, 2013-2016 рр.), науково-технічної програми «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» в межах наукового проекту «Створення смарт-сенсорних приладів для аналізу креатиніну та йонів амонію на основі нових нанокompозитних плівок. Розділ 1. Розробка амперометричного портативного аналізатора, сумісного із сучасними гаджетами, для визначення креатиніну та йонів амонію» (№ держреєстрації 0118U006259, 2018-2022 рр.) та в рамках конкурсів НФД України “Підтримка досліджень провідних та молодих вчених” (грант 2020.02/0100 «Створення нових нанозимів як каталітичних елементів для ензиматичних наборів та хемо/біосенсорів», № держреєстрації 0120U104115, 2020-2022 рр.) та «Наука для безпеки і сталого розвитку України» (грант 2021.01/0010 «Створення ензиматичного набору та портативних біосенсорів для експрес-аналізу креатиніну – маркера гострих функціональних порушень нирок», № держреєстрації 0123U102859, 2023-2025 рр.). Автор дисертаційної роботи є одним із виконавців вищезгаданих досліджень. Робота виконувалась також у рамках міжнародного наукового гранту НАТО «Наука заради миру»: «Сучасні електрохімічні наносенсиори для виявлення токсичних йонів» (SPS(NUKR)SFPP 984173, 2012 – 2016 рр.) та міжнародних індивідуальних проєктів: FEMS-2013 (UA-SMU2013-1Stasyuk) «The development of the new bioanalytical approaches for L-arginine assay by the use recombinant human liver arginase I and the yeast cells, over-producers of the target enzyme»; FEBS-2022 “Enzymatic biofuel cells and bionanosensors

for monitoring of creatinine, a marker of acute functional disorders of the kidneys”, гранту для підтримки молодих вчених провідних вищих навчальних закладів та наукових установ від компанії «ОПТЕК» для проведення наукового дослідження: «The development of the new bioanalytical approaches for L-arginine assay by the use of recombinant human liver arginase I conjugated with nanocarriers» (2014 p.) та стипендії президента України для молодих вчених у 2016-2017 р.

Метою дослідження було вивчення структурних, фізико-хімічних і каталітичних властивостей штучних ензимів – нанозимів у поєднанні з мікробними ензимами для створення на їхній основі нових діагностичних методів, придатних для використання у клінічній діагностиці, фармацевтиці та харчових технологіях, а також вивчення біологічної дії нанозимних композитів на еукаріотичні, зокрема дріжджові клітини.

Для досягнення поставленої мети до завдань роботи входило:

1. Провести синтез і скринінг нових наноматеріалів на псевдоензиматичну активність. Дослідити каталітичні властивості та субстратну специфічність отриманих нанозимів (НЗ).
2. Отримати НЗ із каталазною активністю та дослідити біологічну та можливу цитотоксичну дію «катазимів» на еукаріотичні клітини метилотрофних дріжджів *Hansenula (Ogataea) polymorpha C-105 (gcr1 catX)*.
3. Отримати НЗ із редуктазною активністю та протестувати їх на антиоксидантну активність відносно вільних радикалів АБТС⁺ та DPPH[•]. На основі найактивніших редуктазних НЗ сконструювати амперометричний біосенсор для аналізу вмісту селеніту та протестувати його на реальних зразках.
4. Отримати НЗ із пероксидазною активністю та сконструювати амперометричні біосенсиори на основі різних мікробних оксидаз та НЗ як міметиків пероксидази. Створені біоелектроди протестувати для аналізу вмісту етанолу, метиламіну та L-аргініну.
5. Синтезувати нові метал-гібридні наноматеріали та електропровідні полімери селективні до іонів амонію, та сконструювати на їхній основі біосенсиори з використанням мікробних деаміназ (аргініндеімінази та креатиніндеімінази) для кількісного аналізу вмісту L-аргініну та креатиніну.
6. Розробити ензиматичні методи кількісного аналізу вмісту L-аргініну із флуоресцентним і спектрофотометричним способом детектування кольорового продукту реакції на основі аргінін-гідролізуючих ензимів: аргінази I та аргініндеімінази.
7. На моделі високоочищеної Манганзалежної рекомбінантної людської аргінази I провести дослідження з отримання препаратів апоензиму, позбавленого металу, та реконструкції холоензиму. Дослідити можливість використання препаратів апоензиму аргінази I для ензиматичного моніторингу вмісту іонів Mn²⁺ та Co²⁺ у зразках стічних вод.
8. Сконструювати амперометричний біосенсор для аналізу вмісту креатиніну за використання рекомбінантної КДІ та НЧ CoCu, чутливих до N-метилгідантоїну, та дослідити можливу структуру утвореного комплексу.
9. Провести апробацію розроблених біоаналітичних підходів на реальних зразках рідин людини, харчових продуктів, стічних вод та фармацевтичних препаратів.

Об'єкт дослідження – очищені препарати мікробних оксидоредуктаз та деаміназ, нанорозмірні матеріали з ензимоподібною активністю; комбінації природних ензимів із нанозимами.

Предмет дослідження – структурно-функціональні та каталітичні властивості наноматеріалів, кон'югованих з ензимами; дія нанозимів на клітини дріжджів; використання синтетичних нанокомпозитів для створення нових біосенсорних та ензиматичних методів аналізу.

Методи дослідження. У роботі використано різноманітні мікробіологічні, генно-інженерні, біохімічні, фізико-хімічні, електрохімічні, аналітичні та біосенсорні методи дослідження. При аналізі активності ензимів та чистоти ензимних препаратів використано методи спектрофотометричного аналізу, електрофорезу білків за нативних та денатуруючих умов, іонообмінна та афінна хроматографія. Для фізико-хімічного та структурного аналізу наноматеріалів використано методи сканувальної електронної мікроскопії, флуоресцентної мікроскопії, рентгеноспектрального та рентгеноструктурного аналізу, атомно-силової мікроскопії, трансмісійної електронної мікроскопії, динамічного світлорозсіювання, Раман-спектроскопії, спектроскопії ядерного магнітного резонансу, а також метод математичного моделювання фізичної сорбції. При конструюванні амперометричних біосенсорів використано циклічну вольтамперометрію, хроноамперометрію та статистичний аналіз.

Наукова новизна отриманих результатів. Уперше в науковій практиці показано можливість заміни природного ензиму – каталази штучними «катазимами», які повністю відновлюють здатність мутантних безкаталазних клітин метилотрофних дріжджів рости у середовищі, що містить метанол. Молекулярно-генетичний аналіз та секвенування локусу геному безкаталазного штаму дріжджів *Ogataea polymorpha* C-105 виявив дві мутації у гені каталази: заміна азотистої основи цитозину (C) у 895 положенні кодуючої послідовності на іншу азотисту основу тимін (T) та делеція C у положенні 896. Така комбінація веде до зсуву рамки зчитування і утворення стоп-кодону TGA, що спричинює у клітинах штаму C-105 продукцію нефункціонального, неповного протеїну. Уперше показано цитотоксичну дію синтезованих нанозимів на клітини дріжджів *O. polymorpha*. На моделі високоочищеної Манган-залежної рекомбінантної людської аргінази I отримано препарати апоензиму, позбавленого металу, та здійснено реконструкцію холоензиму. Вперше розроблено новий ензиматичний метод на основі апоензиму аргінази I та 2,3-бутандіонмонооксиму для селективного та ультрочутливого визначення вмісту іонів Mn^{2+} та Co^{2+} (на рівні 1 пМ та 2,5 пМ для іонів Mn^{2+} та Co^{2+} , відповідно). Вперше опрацьовано чутливі та селективні ензиматичні методи кількісного аналізу вмісту L-аргініну із флуоресцентним та спектрофотометричним способом детектування кольорового продукту реакції за допомогою *o*-фталевого альдегіду та високоочищених препаратів аргінази I і уреазі або аргініндеїмінази. Уперше використано поєднання каталітичних наноматеріалів і високоочищених препаратів ензимів класу гідролаз: аргінази I, креатиніндеїмінази, аргініндеїмінази при формуванні біоселективних елементів амперометричних біосенсорів на L-аргінін та креатинін. Уперше за використання наноміметиків пероксидази і алкогольоксидази створено нові ензимо-нанозимні методи аналізу вмісту етанолу.

Практичне значення отриманих результатів. Отримано нові нанозимні композити, придатні для біоаналітичного використання. Опрацьовано нові ензиматичні методи та відповідні біоаналітичні набори для визначення вмісту L-аргініну та креатиніну, а також створено прототипи ензимних та мікробних біосенсорів на основі очищених препаратів ензимів класу гідролаз, клітин надпродуцентних штамів дріжджів та метал-гібридних наночастинок.

Опрацьовано нові методи ензиматичного та біосенсорного моніторингу етанолу, L-аргініну, глюкози та метиламіну на основі L-селективних оксидоредуктаз та наноміметиків пероксидази.

За результатами виконання дисертаційної роботи одержано три патенти України на корисну модель (№142490 від 10.06.2020 р.; №107543 від 10.06.2016 р.; №108773 від 25.07.2016 р.), що стосуються розробки ензиматичних методів для кількісного визначення L-аргініну, креатиніну та амонію в біологічних рідинах людини, у харчових продуктах та алкогольних напоях за використання високоочищених препаратів аргінази I, крatinіндеїмінази та аргініндеїмінази, відповідно.

Особистий внесок здобувача. Роботи здобувачки, представлені в цій дисертації, ґрунтуються на результатах отриманих нею особисто, або за її безпосередньої участі чи під її керівництвом. Автором проведено науковий пошук і критичний аналіз наявних даних літератури щодо обґрунтування вибору оптимального нанозиму та його поєднання із ензимом для створення біоаналітичних систем, придатних для аналізу вмісту практично важливих сполук. Мету і завдання дослідження, а також планування експериментів, аналіз та обговорення отриманих результатів проведено спільно із д.б.н., проф. М.В. Гончаром. Експериментальні дослідження, результати яких викладені в дисертації, проведено спільно зі співавторами відповідних публікацій.

Апробація результатів дисертації. Основні положення роботи опубліковано у вигляді наукових статей у профільних журналах та представлено у формі тез усних або стендових доповідей на міжнародних наукових конференціях. Результати роботи доповідалися на V Польсько-Українській Вайглівській мікробіологічній конференції (Чернівці, Україна, 2013), IV з'їзді Українського товариства клітинної біології (Ужгород, Україна, 2014), V міжнародній науковій конференції молодих учених „Human - Nutrition - Environment” “Biotechnology for sustainable development” (Rzeszow, Poland 2014), XXVII Міжнародній конференції з генетики та молекулярної біології дріжджів (Levico Terme, Italy, 2015), Міжнародній конференції "Актуальні проблеми клітинної біології та біотехнології" (Львів, Україна, 2015), V з'їзді Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Одеса, Україна, 2016), VII Польсько-Українській Вайглівській мікробіологічній конференції (Львів, Україна, 2017), III Міжнародній науковій конференції “Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st Century” (Київ, Україна, 2018), Міжнародній конференції “Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application” (Rzeszow, Poland, 2018) та Міжнародній конференції “Advances in Microbiology and Biotechnology” (Львів, Україна, 2018).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 59 наукових праць, включаючи 24 статті у фахових виданнях (20 – у закордонних та 4 – у вітчизняних виданнях), з

них 16 статей у виданнях, віднесених до першого і другого квартилів (*Q1* і *Q2*) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank, 6 розділів монографій (4 – у закордонних, із них – 2 огляди належать до *Q1* SCImago та 2 – у вітчизняному виданні), 3 патенти України на корисну модель, 26 тез доповідей на міжнародних наукових конференціях. Сумарний імпакт фактор публікацій за темою дисертації – 90,82.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота є кваліфікаційною науковою працею на правах наукової доповіді за сукупністю статей, викладена на 516 друкованих сторінках. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, розділу матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, узагальнення результатів досліджень, висновків, переліку використаних джерел і додатка.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **першому розділі** викладено **огляд літератури** за темою дисертації. В цьому розділі розглянуто основні, відомі на сьогодні аспекти синтезу нанозимів, їхні переваги порівняно з природними ензимами та перспективи практичного застосування. Проведено детальний аналіз оцінки каталітичної ефективності нанозимів за їхніми каталітичними параметрами. Розглянуто основні досягнення в галузі створення мікробних та ензимних амперометричних біосенсорів на основі дріжджових клітин, ензимів та нанозимів, а також перспективи їхнього використання в клінічній діагностиці та для контролю якості харчових продуктів з метою аналізу вмісту практично важливих сполук, зокрема, L-аргініну, L-лактату, глюкози, етанолу та метиламіну. Розглянуто сучасні біоаналітичні підходи щодо кількісного визначення вмісту креатиніну, зокрема ензиматичні та біосенсорні на основі використання креатиніндеїмінази та наноматеріалів.

У **другому розділі** дисертаційної роботи наведено **матеріали і методи досліджень**. Зокрема, перелічено штами дріжджів та бактерій, які використовувалися в роботі. Наведено перелік і деталі основних методів досліджень. Серед мікробіологічних методів досліджень описано умови і особливості культивування різних штамів дріжджів та бактерій. Як надпродуценти цільових ензимів (аргінази I, аргініндеїмінази, креатиніндеїмінази, флавоцитохрому *b*₂, алкогольоксидази та метиламінооксидази) використовували рекомбінантні штами метилотрофних дріжджів та бактерій, сконструйовані в Інституті біології клітини НАН України. Як джерело аргінінооксидази використали ізольований із природи гриб *Ammanita phalloides*. Дріжджові штами *O. polymorpha* культивували при 37 °C у багатому середовищі YPD [Ausubel et al., 1990, <https://doi.org/10.1002/mrd.1080010210>] або у мінеральному середовищі Беркгольдера. Бактерії *Escherichia coli* DH5α вирощували при 37 °C у багатому середовищі LB [Ausubel et al., 1990, <https://doi.org/10.1002/mrd.1080010210>]. Агаризовані середовища для дріжджових і бактерійних штамів містили 2 % агар. Біомасу дріжджів визначали нефелометрично на спектрофотометрі Helios (540 нм, кювета 1 см), розраховуючи суху масу за калібрувальною кривою. Концентрацію білка в безклітинних екстрактах визначали методом Лоурі [Lowry et al., 1951].

Для проведення молекулярно-генетичного аналізу природи мутації *catX* у безкаталазного мутанта метилотрофних дріжджів *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*), хромосомну ДНК виділяли методом м'якого лізису з SDS та попередньою обробкою літиказою ("Sigma-Aldrich", США). Ампліфікацію проводили з використанням Q-5 ДНК полімерази (NEB, США) на приладі MasterCycler (Eppendorf, Німеччина). ПЛР-продукти аналізували за допомогою електрофорезу в агарозному гелі та очищали, застосовуючи набір QIAquick (Qiagen, Німеччина). Отримані фрагменти використовували як матриці в реакціях секвенування з вихідними праймерами (4 реакції - CAT_F1.1, CAT_R1.1, CAT_F1.2, CAT_R1.2). Секвенування за Сенджером здійснювали з набором BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fischer Scientific, США). Фрагменти аналізували на приладі ABI PRISM 3130xl (Thermo Fischer Scientific, США). Аналіз результатів проводили з використанням програми Geneious Prime (Biomatters Ltd, Нова Зеландія). У роботі використано інформацію про геноми *O. polymorpha* NCYC 495 leu1.1 (GenBank assembly ref. number GCF_001664045.1) та *O. parapolymorpha* DL-1 (GCA_000187245.3).

Серед біохімічних методів досліджень у другому розділі описано методи кількісного аналізу ензиматичної та псевдоензиматичної активності ензимів (аргінази I, аргініндеїмінази, креатиніндеїмінази, флавоцитохрому *b₂*, алкогольоксидази та метиламінооксидази) та нанозимів; референтні методи аналізу цільових аналітів і способи підготовки реальних зразків. Описано методи виділення та очищення ензимів із відповідних джерел.

(His)₆-таговану креатиніндеїміназу, продукт гена *codA* із *Corynebacterium glutamicum* (КДІ, КФ 3.5.4.21) виділяли з нерозчинних «тілець включення» рекомбінантних клітин *E. coli* та очищували за допомогою металоафінної хроматографії на кульках Ni-NTA Superflow (Qiagen). Вихід КДІ становив 30 мг/л культури. При ліофілізації у присутності трегалози КДІ не втрачала своєї активності впродовж 120 днів зберігання при – 20 °С.

Рекомбінантну аргіназу I (КФ 3.5.3.1) виділяли методом афінної колонкової хроматографії із безклітинного екстракту штама-надпродуцента на синтезованому нами сорбенті – L-аргінін-макропористе скло. Одержано препарати аргінази I з питомою активністю 1500 – 2600 Од·мг⁻¹ білка із 40 – 60-кратною очисткою та 42 %-овим виходом у кращих фракціях. Препарати зберігалися за певних умов без втрати активності впродовж року, а за 3 роки зберігання ензиматична активність падала лише удвічі.

Рекомбінантну аргініндеїміназу (АДІ, КФ 3.5.3.6) виділяли з нерозчинних «тілець включення», як описано раніше [Fayuga *et al.*, 2013, <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.06.025>] та очищували за допомогою аніонної та гідрофобної хроматографії на сорбентах QAE-сефароза та феніл-сефароза. Одержаний електрофоретично гомогенний препарат АДІ (до 180 Од·мг⁻¹) зберігався без втрати активності упродовж 20 місяців.

Алкогольоксидазу (АО, КФ 1.1.3.13) виділяли з безклітинного екстракту штаму-надпродуцента *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*) за допомогою двостадійного фракціонування сульфатом амонію (при 30 і 70% насичення) з подальшою йонообмінною хроматографією на DEAE-Toyopearl 650 M. Очищену АО з питомою

активністю $20 \text{ Од} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка зберігали у вигляді суспензії в 70% сульфаті амонію, 50 мМ фосфатному буфері (ФБ) рН 7,5 при 4°C .

(His)₆-таговану метиламіноксидазу із дріжджів *O. polymorpha* (МАО, КФ 1.4.3.21) очищали з безклітинного екстракту рекомбінантного штаму дріжджів *S. cerevisiae* W303 за допомогою металоафінної хроматографії на Ni-NTA-агарозі. Активність МАО визначали за швидкістю утворення гідроген пероксиду в реакції з метиламіном за результатами перекисного окиснення АБТС у присутності пероксидази. Очищену МАО з питомою активністю $16 \text{ Од} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка зберігали у 20 % гліцеролі, 30 мМ ФБ рН 7,5 при -20°C .

Аргініноксидазу (АргО, КФ 1.4.3.25) з гриба *Amanita phalloides* очищали йонообмінною хроматографією на Toyopearl DEAE-650M [Stasyuk *et al.*, 2021]. Частково очищений препарат АргО з питомою активністю $7,9 \text{ мОд} \cdot \text{мг}^{-1}$ білка зберігали у вигляді суспензії в 70% сульфаті амонію, 50 мМ фосфатному буфері, рН 7,5, при 4°C .

Флавоцитохром b_2 (ФЦ b_2 , КФ 1.1.2.3, L-лактат цитохром: с оксидоредуктаза) очищали з безклітинного екстракту дріжджів *O. polymorpha* за допомогою йонообмінної хроматографії на Toyopearl DEAE-650M (до $40 \text{ Од} \cdot \text{мг}^{-1}$). Висолювання ферменту проводили додаванням до елюату сухого сульфату амонію до 70 % (від насичення при 0°C при контролі рН близько 7,0 – 7,5). Стабілізований таким чином ензим зберігав свою активність упродовж двох місяців при -25°C .

Моно- та біметалеві нанозими одержували методами відновлення відповідних солей Натрій боргідридод, аскорбіновою кислотою, глюкозою, Натрій цитратом або відновленням на металевій пластині. Розмір та структуру отриманих наноматеріалів визначали за результатами сканувальної, трансмісійної, флуоресцентної, атомно-силової мікроскопії та рентгенівського фазового аналізу. На поверхні синтезованих НЧ формували шар ω -меркаптогексадеканової кислоти та іммобілізували на її поверхні аргіназу I за допомогою карбодіімідо-пентафлуорофенольного методу [Stasyuk *et al.*, 2019, DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.01.117]. Отримані біонаночаси використовували для формування біоселективного елемента амперометричної сенсорної системи.

Амперометричні біосенсори конструювали на базі потенціостату Metrohm Autolab PGSTAT30 за використання трьохелектродної сенсорної конфігурації: хлорсрібний електрод (Ag/AgCl/3 М KCl) – як електрод порівняння, як допоміжний – стержневий платиновий електрод (діаметр 1 мм). У ролі робочих електродів використовували комерційний платиновий електрод (діаметром 7,0 мм), дисковий скловугільний електрод (Mineral, діаметром 1,5 та 3,0 мм) та графітовий електрод (діаметром 3,03 мм).

Перед приготуванням біоелектродів платиновий та скловугільний електроди полірували на полірувальній тканині, використовуючи алюмінієву оксидну пасту (Лесо, ФРН) з різним діаметром частинок (1,0; 0,5 та 0,3 мм). Відполіровані електроди відмивали водою та 96 % етиловим спиртом. Робочу поверхню графітових електродів полірували на наждачному папері та відмивали водою в ультразвуковій лазні 10-15 хв.

Усі амперометричні вимірювання проводили при кімнатній температурі в скляній комірці об'ємом 50 мл, заповненій 10 мл 50 мМ ФБ, зі значенням рН, залежним

від мети експерименту. Біосенсор поміщали у розчин, з інтенсивним перемішуванням і, після встановлення базового сигналу, в комірку вносили певний аналіт.

Для забезпечення іммобілізації біоелемента (ензимів, біонаноккомпозитів та пермеабілізованих клітин рекомбінантних штамів *O. polymorpha*) на поверхні робочих електродів, використовували різні процедури та методи:

1) Утримання діалізною плівкою: 2–4 мкл розчину ензиму або 2 мкл суспензії пермеабілізованих клітин *O. polymorpha* ($50 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$) наносили крапельним методом порціями по 2 мкл на поверхню електрода і залишали підсихати при 4°C упродовж 10 хв. Електрод покривали стандартною діалізною мембраною ($1 \times 1 \text{ см}$). Для утримання діалізної мембрани використовували «О-подібне» кільце діаметром 5 мм (для торцевих графітових електродів) або плівку скотчу (при використанні планарних електродів). Перед використанням, електроди промивали 20 мМ ФБ буфером із відповідним рН (в залежності, від рН-оптимуму ензиму).

2) Осадження катодним полімером: 2–4 мкл розчину ензиму або суспензії клітин наносили крапельним методом на поверхню електрода та підсушували при кімнатній температурі упродовж 5 хв. Поверх сформованої біоплівки наносили 8 мкл розведеного в 10 разів катодного полімеру (GY 83-0270 005). При цьому відбувалось осадження полімеру і формувалася міцна полімерна плівка, що утримувала сенсорний біоелемент. Електроди промивали 20 мМ ФБ буфером із відповідним рН та зберігали при $+4^\circ\text{C}$ до їх використання.

3) Покриття плівкою 1 % Нафіону: 2–4 мкл розчину ензиму або 2 мкл суспензії клітин наносили крапельним методом на поверхню електрода та підсушували при кімнатній температурі упродовж 5 хв. Поверх сформованої біоплівки, наносили 8 мкл 1% нейтралізованого Нафіону. При цьому формувалась міцна полімерна плівка, що утримувала біоелемент. Електроди промивали 20 мМ ФБ буфером із відповідним рН та зберігали при $+4^\circ\text{C}$ до їхнього використання.

4) «Перехресне зшивання» ензимів і наноензимів на поверхні електрода: для формування біоелектрода, 2 мкл суспензії НЧ ($0,1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$) наносили крапельним методом на поверхню електрода та підсушували при кімнатній температурі упродовж 5 хв. Опісля, аліквоту суміші, що містила цистеамін (1 мМ) і глутаровий альдегід (1%), поміщали на поверхню електрода і висувували на повітрі. Активовані НЧ промивали 50 мМ фосфатним буфером, рН 7,0 і використовували для подальшої іммобілізації ензимів методом перехресного зшивання.

5) Ковалентна кон'югація ензимів: 2 мкл суспензії НЧ ($0,1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$) наносили крапельним методом на поверхню електрода та підсушували при кімнатній температурі упродовж 5 хв. Згодом, на поверхню робочого електрода наносили 5 мкл 5 мМ ω -меркаптогексадеканої кислоти. Електрод витримували упродовж 1 год. при кімнатній температурі та вносили 5 мкл суміші, що містила 2 мМ 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодімід та 5 мМ N-гідроксисукцинімід в етанолі. Електрод витримували при $+8^\circ\text{C}$ упродовж 12 год. Далі поверхню електрода промивали 20 мМ ацетатним буфером, рН 5,5 (для усунення надлишку реагентів) та вносили 3 мкл відповідного ензиму. Після підсихання електрода проводили наступні електрохімічні дослідження.

Усі досліди проводили у трьох-шести повторах. Для кожної вибірки показників визначали середнє арифметичне значення (М), стандартну похибку

середнього (m) та середнє арифметичне відхилення (σ). Для розроблених аналітичних методів розраховували коефіцієнт варіації (C_v , %). Розрахунок статистичних показників і побудову графіків проводили за допомогою програми OriginPro 8,5. Лінеаризацію графіків проводили за рівнянням регресії $Y = A + B \cdot X$ (A і B – параметри рівняння), розраховували коефіцієнт кореляції R та рівень достовірності зв'язку p (для події $R = 0$). Вказані параметри та статистичні показники наведені в рисунках та таблицях.

У **третьому розділі** наведено результати дослідження структурних, фізико-хімічних та каталітичних властивостей нанозимів (НЗ) для оцінки можливості використання цих наноматеріалів у біосенсорних технологіях. Проведено структурну характеристику отриманих НЗ за використання методів сканувальної електронної, флуоресцентної, трансмісійної, атомно-силової мікроскопії; рентгено-спектрального аналізу та динамічного світлорозсіювання. Встановлено, що розмір отриманих матеріалів становить у межах 10 – 100 нм (нанозими, НЗ) і до 5 мкм (мікрозими, МЗ) (Рис. 1 а).

Здійснено скринінг монометалевих (Cd, Ce), біметалевих (Cd/Cu, Ce/Pd, Pt/Cu, Ce/Cu, Pd/Cd, Pd/Cu) та триметалевих (Zn/Cd/Cu) наночастинок (НЧ) на редуктазну активність. Досліджували ензимоподібну активність отриманих НЧ відносно різних субстратів. Встановлено, що НЧ Zn/Cd/Cu виявляють найвищу редуктазну активність в розчині. Для кількісної оцінки редуктазної активності використовували реакцію із АБТС катіон-радикалом (АБТС^{•+}). Так, при введенні НЧ у реакційну суміш концентрація катіон-радикалу зменшувалась, при цьому спостерігалось еквімолярне до катіон-радикалу утворення АБТС, тобто, в присутності НЧ відбувається відновлення катіон-радикалу до вихідної молекули. Розрахована за цією реакцією псевдо-редуктазна активність НЧ Zn/Cd/Cu становила 1,3 Од./мг. Отримані НЗ Zn/Cd/Cu протестовано на антиоксидантну активність відносно вільних радикалів АБТС^{•+} та DPPH[•] (2,2-дифеніл-1-пікрилгідразильний радикал) у порівнянні із Тролоксом: значення напівмаксимального інгібування (IC_{50}) для НЗ Zn/Cd/Cu становить $6,8 \pm 0,2$ мкг/мл, що близько до Тролоксу ($2,70 \pm 0,1$ мкг/мл). Синтезовані НЗ використано для конструювання амперометричного біонаносенсора для аналізу вмісту селеніту. Загальну схему реакцій, що протікають на поверхні електрода, можна описати так: іони SeO_3^{2-} дифундують до поверхні графітового електрода, модифікованого НЧ Zn/Cd/Cu і відновлюються до Se^0 у присутності NADH. При цьому, кофактор NADH окиснюється до NAD^+ , а його регенерація до NADH здійснюється завдяки АБТС, який окиснюється до АБТС^{•+}. Останній відновлюється до АБТС за рахунок НЗ на електроді, забезпечуючи тяглість процесу (Рис. 1 б).

Хроамперометричний аналіз Na_2SeO_3 при -50 мВ представлений на Рис. 1 в. Вивчали основні біоаналітичні характеристики (нижня межа визначення, лінійність відгуку, селективність) сконструйованого біосенсора (Рис. 1 г). Як показано, максимальний струм хроамперометричного відклику на йони SeO_3^{2-} для електрода модифікованого НЗ Zn/Cd/Cu становить $142,3 \pm 3,0$ мкА з позірною величиною константи Міхаеліса-Ментен (K_M^{p03}) $1,25 \pm 0,05$ мМ. Чутливість для електрода з архітектурою Zn/Cd/Cu/ГЕ становить $1700 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$. Лінійний діапазон визначення

вмісту Na_2SeO_3 сконструйованим біонаносенсором складає 0,016 мМ – 1 мМ ($R = 0,995$).

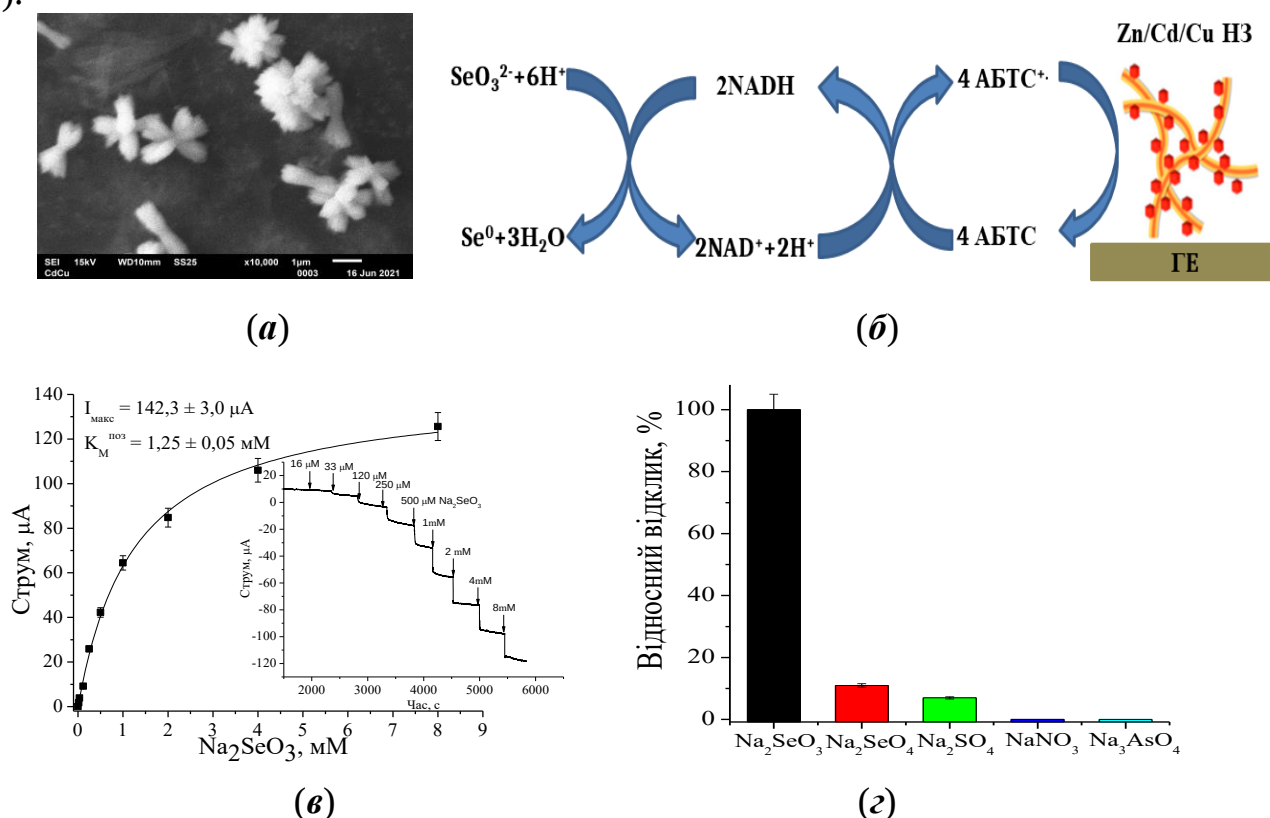


Рис. 1. Характеристика селеніт-чутливого амперометричного біонаносенсора: сканувальна електронна мікроскопія НЧ Zn/Cd/Cu (а); принципова схема функціонування біонаносенсора на основі НЗ Zn/Cd/Cu (б); калібрувальна крива відклику на Na_2SeO_3 (в); тест на селективність для електроду, модифікованого НЗ Zn/Cd/Cu, на внесені аналіти (1 мМ) у присутності 0,13 мМ NADH та 1 мМ АБТС (г). Умови: робочий потенціал –50 мВ проти Ag/AgCl у 50 мМ ацетатний буфер, рН 4,5.

Для синтезованих НЧ аналізували також псевдо-пероксидазну (ПО) активність. Аналіз ПО-активності проводили за використання H_2O_2 (8,8 мМ) як субстрату та *o*-діанізидину в ролі хромогену. Встановлено, що найвищою пероксидазною активністю серед синтезованих НЗ володіють Cu/Ce/Au та Cu. Визначено кінетичні параметри (K_M і k_{cat}) для отриманих НЗ і МЗ та їхніх модифікованих полімерами форм. У пероксидазних реакціях більшість синтезованих НЗ, зокрема, Cu/Ce/Au, Cu, Pt/Cu, Au/Ce/Pt та Pd/Ce виявляють найвищу активність стосовно *o*-діанізидину. Проведено ковалентну модифікацію металевих НЗ, що містять Аурум, поєднанням цистеаміну, глутарового альдегіду та поліетиленіміну. Для отриманих функціоналізованих НЗ досліджено кінетичні характеристики, зокрема величини K_M , V_{max} , k_{cat} та субстратну специфічність. Показано, що функціоналізація НЗ полімерними носіями дозволяє модулювати каталітичні параметри НЗ, дещо змінювати субстратну специфічність та підвищувати їхню стабільність.

Проведено також синтез НЧ Au шляхом інкубації відповідної солі металу із культурою клітин дріжджів *O. polymorpha* NCYC 495 (“*in vivo*”). Електронні спектри поглинання в діапазоні від 250 до 700 нм підтверджують факт утворення НЧ

культурою клітин. Здійснено також структурну характеристику отриманих НЧ за використання методів сканувальної електронної мікроскопії та встановлено, що розмір отриманих наноматеріалів становить у межах 20 – 40 нм.

Четвертий розділ містить результати досліджень впливу НЗ – міметиків каталази на ріст та властивості мутантного безкаталазного штаму дріжджів *Ogataea polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*), здатного до конститутивного синтезу алкогольоксидази (АО) на середовищі, що містить глюкозу, та повністю позбавленого каталазної активності. Дріжджі *O. polymorpha* у своєму геномі містять один ген (OGAPODRAFT_95533), який кодує пероксисомну каталазу. Розмір кодуєчої послідовності становить 1524 п.н. та приблизно 2100 п.н. разом із ймовірною промоторною та термінаторною ділянками. Для встановлення нуклеотидної послідовності ген було розбито на два фрагменти для ампліфікації, розміром 1218 п.н. (фрагмент 1) та 1144 п.н. (фрагмент 2) (Рис. 2). При цьому фрагменти частково перекриваються на 141 п.н.

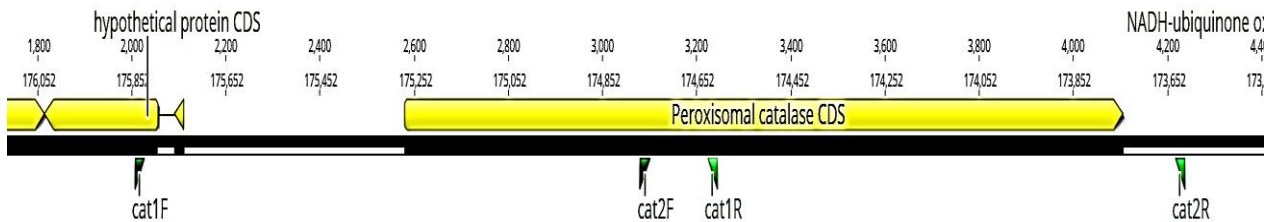


Рис. 2. Схематичне зображення гена OGAPODRAFT_95533, що містить ген каталази, та розміщення праймерів (зелені трикутники) для ампліфікації фрагментів 1 (праймери cat1F (CAT_F1.1 GTGCAATGCGGGCCTGTTTTG) та cat1R (CAT_R1.1 CACTCGCCCTTGGAATTGTAC)) і 2 (праймери cat2F (CAT_F1.2 CATGTTCTGGGACTACCTGACG) та cat2R (CAT_R1.2 CTCGTGCTGTTTTAGGAAGGATG)).

Проведений молекулярно генетичний аналіз та секвенування локусу геному штаму дріжджів *O. polymorpha* C-105 виявив дві мутації у гені каталази: заміна цитозину (C) у 895 положенні кодуєчої послідовності на тимін (T) та делеція C у положенні 896. Така комбінація веде до зсуву рамки зчитування і утворення стоп-кодону TGA, що спричинює у штамі C-105 продукцію нефункціонального, неповного білка (Рис. 3).

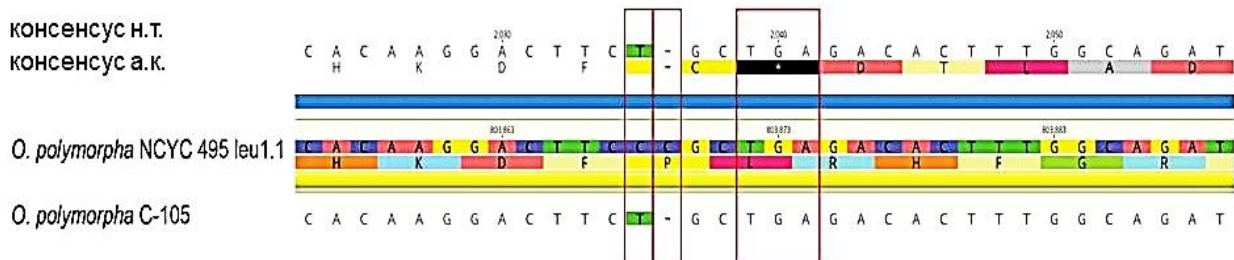


Рис. 3. Картування послідовностей нуклеотидів фрагменту 2 штаму C-105 до ділянки геному *O. polymorpha* NCYC 495 leu1.1, який кодує каталазу. Знизу – послідовність фрагменту 2 (лівий), зверху – консенсусні послідовності нуклеотидів та амінокислот білка. Заміна C на T та делеція C виділені прямокутником. Стоп-

кодон, що виникає у результаті зсуву рамки зчитування, позначено чорним * у консенсусній послідовності амінокислот.

У зв'язку з генетичним блоком каталази мутантні клітини ростуть у середовищі, що містить суміш глюкози з метанолом тільки після тривалого лаг-періоду, необхідного для адаптації клітин до гідроген пероксиду, що генерується в культурі, проте не здатні засвоювати метанол як єдине джерело Карбону та енергії. Здатність клітин безкаталазного штаму рости у середовищі, що містить суміш глюкози та метанолу, при повній відсутності каталазної активності пов'язана з підвищеним синтезом за таких умов росту цитохром *c*-пероксидази, яка здатна розщеплювати токсичний H_2O_2 у пероксидазній реакції з цитохромом *c*.

Нами висунуто гіпотезу про здатність НЗ компенсувати відсутність певного ензиму в клітинах завдяки псевдоензиматичній активності НЗ. Для підтвердження такої гіпотези було вивчено можливість усунення дефекту каталазної активності клітин мутантного штаму дріжджів *O. polymorpha* C-105 за допомогою НЗ, що володіють каталазною активністю – «катазимів». З цією метою до середовища вирощування додавали НЗ Pt та Pt/Au в різних концентраціях (25 – 500 мкг/мл) та вносили клітини дріжджів *O. polymorpha* C-105 (Рис. 4).

Через 24 год. тестували вплив НЧ на ріст клітин (Рис. 4 в). Встановлено, що внесення «катазимів» у середовище відновлює здатність мутантних клітин рости у середовищі з метанолом.

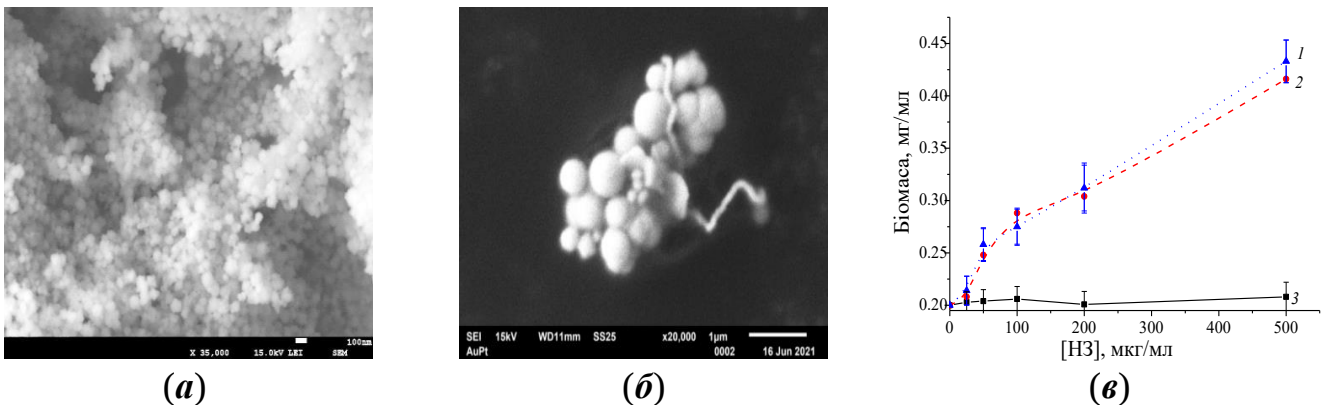


Рис. 4. Сканувальна електронна мікроскопія НЗ Pt (а) та НЗ Pt/Au (б); кінетика росту клітин штаму *O. polymorpha* C-105 (*gcr1 catX*) на середовищі, що містить метанол із внесеними «катазимами» упродовж 24 год.: Pt (1), Pt/Au (2) та контрольні клітини без катазимів (3).

Електронне мікроскопування дріжджових клітин підтвердило поглинання і накопичення НЗ у цитоплазмі клітин *O. polymorpha* C-105 (Рис. 5).

У процесі росту дріжджів у середовищі, що містить метанол та утилізації цього спирту, ключову роль відіграє алкогольоксидазна реакція, в результаті якої утворюються токсичні для клітини сполуки – формальдегід і гідроген пероксид. Тому проаналізовано зміни у накопиченні гідроген пероксиду в культуральному середовищі дріжджів при рості у середовищі, що містить метанол чи суміш глюкози та метанолу за присутності «катазимів» (Рис. 6 а – б).

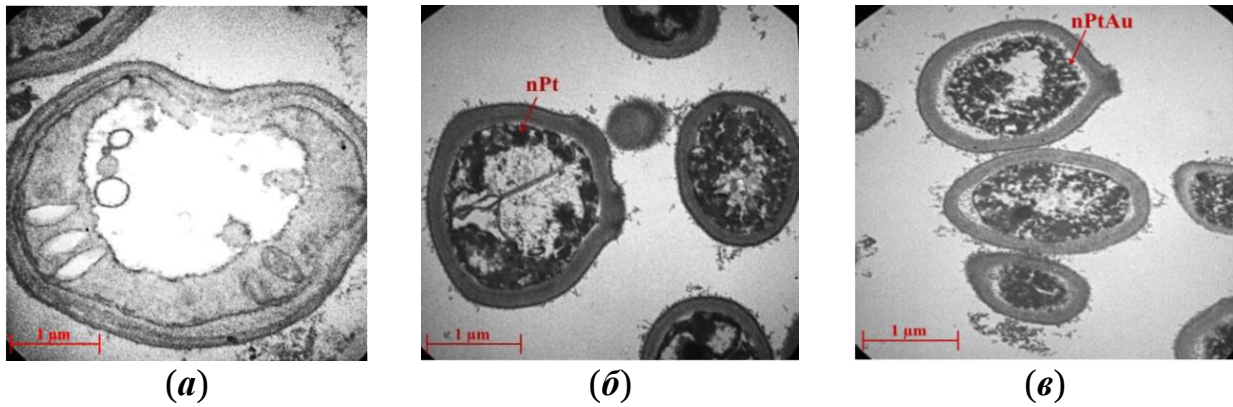


Рис. 5. Трансмісійна електронна мікроскопія клітин, вирощених з НЗ: контрольні клітини, вирощені без НЗ (а); клітини, вирощені з НЗ Pt (б); клітини, вирощені з НЗ Pt/Au (в).

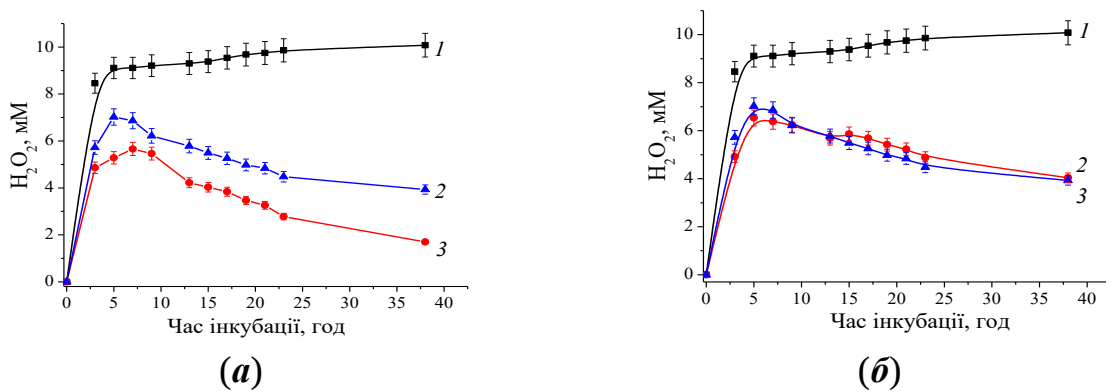


Рис. 6. Вплив катазимів на продукцію гідроген пероксиду у культурі безкаталазного штаму *O. polymorpha* C-105: середовище з метанолом (а); суміш метанол/глюкоза (б). Позначення: 1 – контроль без додавання катазимів; 2 – з внесенням НЗ Pt; 3 – з додаванням НЗ Pt/Au.

Отримані результати вказують на суттєве зниження вмісту генерованого дріжджами гідроген пероксиду у культуральному середовищі при введенні «катазимів». Показано, що на 38 год. інкубації, вміст гідроген пероксиду в культуральному середовищі зменшувався за присутності НЧ Pt 5,9 раза у середовищі, що містило метанол, та у 4,9 раза – у середовищі, що містило суміш глюкози з метанолом, а при додаванні НЧ Pt/Au – у 2,6 раза на обох середовищах. Отже, «катазими» Pt і Pt/Au ефективно виконують функцію відсутньої природної каталази в клітинах мутантного штаму *O. polymorpha* C-105, розщеплюючи генерований клітинами гідроген пероксид і, таким чином, зменшуючи його вміст у культурі.

Показано, що поглинання безкаталазними клітинами «катазимів» Pt і Pt/Au відновлює здатність мутантних клітин рости у середовищі, що містить метанол. Каталазна активність НЗ Pt і Pt/Au забезпечує розщеплення надмірної кількості гідроген пероксиду, що утворюється внаслідок росту клітин у середовищі, що містить метанол, усуваючи його токсичну дію на клітини. Це дає можливість клітинам повноцінно рости та ділитись у середовищі з метанолом. Отже, НЗ із каталазною активністю можуть успішно замінити природну каталазу клітин, виконуючи її детоксикаційну функцію. Аналіз літературних даних дозволяє зробити

висновок, що це перше експериментальне свідчення можливості заміни природного ензиму нанозимом
in vivo.

П'ятий розділ містить результати розробки амперометричних біонаносенсорів на основі нанокомпозитів – хемоміметиків пероксидази і мікробних ензимів, придатних для аналізу вмісту етанолу, глюкози, метиламіну та L-аргініну. З метою збільшення площі поверхні робочого електрода та підвищення чутливості сенсорної системи графітовий електрод додатково модифікували електрохімічно осадженим пористим золотом (пор-Au) (Рис. 7). З наведених даних видно, що отримана поверхня є виражено пористою із розміром пор від 25 до 50 мкм.

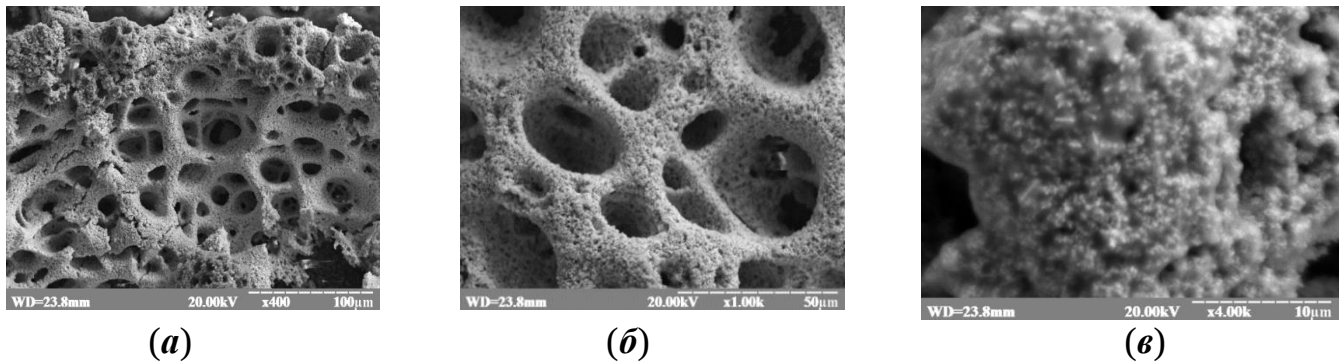


Рис. 7. Сканувальна електронна мікроскопія (а – в) поверхні графітового електрода, модифікованого пористим золотом.

Для дослідження впливу модифікації поверхні електрода на біоаналітичні характеристики біонаносенсорів як хемоміметики ПО вибрано НЧ CuSe у поєднанні з мікробними оксидазами: алкогольоксидазою *O. polymorpha*, глюкозооксидазою *Penicillium vitale*, аргінінооксидазою *A. phalloides* та метиламінооксидазою *O. polymorpha*. В таблиці 1 наведено біоаналітичні характеристики сконструйованих нами біонаносенсорів на основі вказаних мікробних оксидаз, НЧ CuSe та пористого золота. Для фіксації біоселективного шару досліджували різні методи ковалентної та електростатичної кон'югації ензимів на поверхні наноносіїв.

Показано, що модифікація поверхні електрода пористим золотом приводить до покращення аналітичних характеристик усіх сконструйованих біонаносенсорів, порівняно з відповідними біензимними амперометричними електродами, що містять природну ПО, зокрема, встановлено, що після модифікації поверхні електроду НЗ CuSe чутливість зростає від 4 до 18 разів (для електрода з конфігурацією MAO/CuSe/порAu/ГЕ) порівняно з контрольним біосенсором з використанням ПО.

Нами створено новий ензимо–нанозимний спектрофотометричний метод аналізу вмісту етанолу за використання АО, НЗ PtCu та 3,3',5,5'-тетраметилбензидину як органічного хромогену. Для формування біонанокомпозиту використано кальцій альгінатні кульки. Запропонований ензиматичний метод володіє широким діапазоном лінійності: від 0,01 мМ до 0,15 мМ з нижньою межею виявлення етанолу – 3,3 мкМ. Розроблений метод використано для кількісного визначення вмісту етанолу в алкогольних напоях, соках та біологічних рідинах людини. Запропонований метод є чутливим, економним та може використовуватися для рутинного аналізу вмісту етанолу у клінічних та заводських лабораторіях.

Таблиця 1

Характеристики біонаноелектродів на основі мікробних оксидаз, міметиків ПО і пористого золота

Ензим	Модифікована поверхня ГЕ ¹	Потенціал, мВ	Чутливість, $A \cdot M^{-1} \cdot m^{-2}$	Лінійний діапазон, мМ	HMB ² , мкМ	*I _{макс} , мкА	K _М ^{поз} , мМ
АО	ПО/ГЕ	-50	22	0,13 – 0,9	39	0,255	0,68
	CeCu/ГЕ	-50	32	0,05 – 2,1	15	1,57	5,05
	CeCu/пор-Au/ГЕ	-50	102	0,033 – 0,50	10	1,12	1,23
³ ГО	ПО/ГЕ	-50	44	0,5 – 5,0	150	0,30	5,23
	CeCu/ГЕ	-50	73	0,5 – 7,3	150	1,16	18
	CeCu/пор-Au/ГЕ	-50	400	0,25 – 2,0	75,7	2,31	5,81
⁴ МАО	ПО/ГЕ	-250	7,1	0,2 – 1,7	130	0,19	2,07
	CeCu/ГЕ	-250	35	0,06 – 1,7	18	0,92	2,15
	CeCu/пор-Au/ГЕ	-250	125	0,06 – 0,5	18	0,89	0,55
⁵ АргО	CeCu/ГЕ	-150	113	0,05 – 2,25	15	2,56	1,5
	CeCu/пор-Au/ГЕ	-150	200	0,1 – 0,5	33	1,73	0,83

Примітка: ¹ГЕ – графітовий електрод; ²HMB – нижня межа визначення; ³ГО – глюкозооксидаза; ⁴МАО – метиламінооксидаза; ⁵АргО – аргінінооксидаза; * При площі електрода 7,0 мм².

Проведено конструювання біонанозимних електродів на основі електроосажденного наноконкомпозиту PtRu, що виконує роль міметика пероксидази, та мікробних оксидаз (АО та МАО). Усі створені біонаноелектроди продемонстрували достатню чутливість до цільових аналітів: 336 та 284 $A \cdot M^{-1} \cdot m^{-2}$ до етанолу та метиламіну, відповідно; широкі лінійні діапазони: 25–200 мкМ і 20 – 600 мкМ (до етанолу та метиламіну, відповідно), задовільну стабільність при зберіганні та хорошу селективність до цільових субстратів. Показано, що заміна у біочутливому шарі природної ПО на її штучний ПО-міметик PtRu забезпечує покращення електрохімічних властивостей електродів і розширення діапазонів лінійних відгуків. Сконструйовані біонаноелектроди тестували на реальних зразках харчових продуктів (алкогольних напоїв та екстрактів рибних продуктів).

Шостий розділ висвітлює результати дослідження впливу наноматеріалів на сенсорні властивості рекомбінантних клітин дріжджів, здатних до надсинтезу ензимів аналітичного призначення, на моделі двох оксидоредуктаз (флавоцитохрому *b₂* і АО) та гідролази (аргінази I) у складі наноконкомпозитних носіїв (порівняно з традиційними матеріалами). Крім того, вивчено можливість посилення каталітичної активності рекомбінантних клітин шляхом додаткового введення в них відповідних ензимів, кон'югованих із НЧ.

У роботі використовували клітини різних штамів метилотрофних дріжджів *O. polymorpha*: рекомбінантний надпродуцент аргінази I людини – *O. polymorpha* NCYC 495 (*pGAP1-HsARG1 leu2car1:LEU2*); рекомбінантний надпродуцент

флавоцитохрому b_2 – *O. polymorpha* “tr1” (*gcr1 catX/prAOX_CYB2*) та “дикий” штам *O. polymorpha* NCYC 495. Як носій для іммобілізації ензимів використовували НЧ Au, отримані методом хімічного відновлення з відповідної солі. Вихід за активністю ензимів, іммобілізованих на поверхні НЧ, великою мірою залежить від їхньої природи. Якщо для ФЦ b_2 він становив 15 %, то для АО та аргінази I – 55 % та 47,5 %, відповідно. Згодом, пермеабілізовані клітини збагачували біофункціоналізованими НЧ Au. Ефект проникнення біофункціоналізованих НЧ Au крізь пори клітин підтверджували за допомогою рентгеноспектрального аналізу, який виявив наявність слідових кількостей золота всередині пермеабілізованих клітин. На основі збагачених клітин сконструйовано амперометричні клітинні біосенсиори.

Для конструювання біоелектрода для аналізу вмісту L-аргініну використано амоній-чутливу поліанілінову хемосенсорну мембрану (ПАНі). Результати хроноамперометричного дослідження відклику біосенсора з архітектурою селективного шару: уреаза-пермеабілізовані клітини *O. polymorpha*-ПАНі-Нафіон/Pt електрод на внесений L-аргінін відображено на Рис. 8. Лінійність відгуку сконструйованого біосенсора спостерігається в інтервалі концентрацій 0,14 мМ – 1,2 мМ ($R = 0,999$) (Рис. 8, крива 1). Максимальний струм насичення становить 131 ± 8 нА (при площі електрода $7,0$ мм²). Чутливість сконструйованого біосенсора становить 37 А·М⁻¹·м⁻² із нижньою межею визначення $0,11$ мМ. Для порівняння, наведено амперометричний відклик на внесений L-аргінін із архітектурою селективного шару: уреаза-пермеабілізовані клітини *O. polymorpha*-аргіназа-pAu-ПАНі-Нафіон/Pt електрод (Рис. 8, крива 2). Лінійний діапазон концентрацій L-Arg для сконструйованого клітинно-ензимного біосенсора складає $0,01$ мМ – $0,7$ мМ ($R = 0,999$) (Рис. 8, крива 2). Максимальний струм насичення становить 915 ± 40 нА (при площі електрода $7,0$ мм²). Чутливість біосенсора становить 357 А·М⁻¹·м⁻² із нижньою межею визначення $0,02$ мМ L-аргінін. Отже, модифікація пермеабілізованих рекомбінантних клітин *O. polymorpha* наночастинками pAu зі зв’язаною аргіназою, порівняно із клітинами дріжджів, модифікованих лише pAu, підвищує відгук клітинно-ензимного сенсора у 7 разів. Тестування розробленої біосенсорної системи проводили на зразках вин та соків.

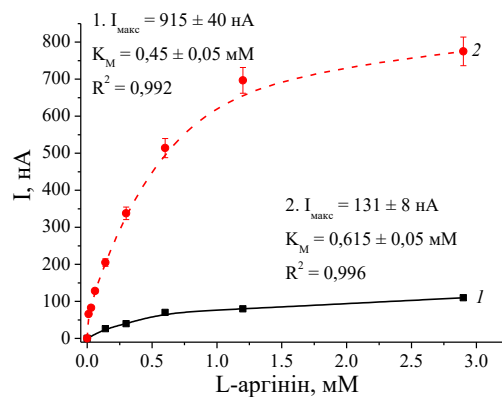


Рис. 8. Калібрувальний графік залежності сили струму від концентрації L-аргініну для біосенсора з архітектурою біоселективного шару: (1) уреаза-пермеабілізовані клітини *O. polymorpha*-ПАНі-Нафіон/Pt електрод; (2) уреаза-пермеабілізовані клітини *O. polymorpha*-аргіназа-pAu-ПАНі-Нафіон/Pt електрод. Умови хроноамперометричного дослідження: потенціал -200 мВ; 30 мМ HEPES

буфер; рН 8,5; 22 °С. Отже, встановлено, що додаткове введення в клітини ензимів, іммобілізованих на Au носіях, істотно поліпшує біоаналітичні характеристики клітинних сенсорів, зокрема, їхню чутливість і швидкість розвитку сигналу.

У цьому розділі представлено результати досліджень щодо розробки амперометричних біо(хемо)сенсорів та ензиматичних методів на основі наночастинок у поєднанні з мікробними гідролазами – рекомбінантною аргініндеїміназою (АДІ), рекомбінантною аргіназою І людини, а також аргініноксидазою (АргО). Принцип аналізу вмісту L-аргініну сконструйованими біоелектродами базується на генеруванні йонів амонію в результаті ензиматичних реакцій (Рис. 9). Утворені йони амонію реагують із амоній-селективними мембранами, генеруючи при цьому сигнал, який детектується за допомогою амперометричних перетворювачів.

Нами сконструйовано також амперометричні біосенсиори для аналізу вмісту L-аргініну за використання металевих НЧ, які здатні утворювати редокс-активні координаційні сполуки з аміаком. Так, в основі запропонованого біоелектроду на основі АДІ лежить принцип ензиматичного гідролізу L-аргініну до L-цитруліну та амонію з наступною детекцією останнього за допомогою амоній-чутливих НЧ Zn(Hg)S/Cu. Вивчали основні біоаналітичні характеристики (чутливість, нижня межа визначення, лінійність відгуку, селективність) для сконструйованого біосенсора. Лінійний діапазон визначення вмісту L-аргініну сконструйованим біосенсором складає 0,013 мМ – 0,8 мМ ($R = 0,998$). Чутливість біосенсора становить $1570 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$ із нижньою межею визначення L-аргініну 4,3 мкМ. Позірна величина константи Міхаеліса-Ментен (K_M) амперометричного біосенсора для L-аргініну складає 1,75 мМ.

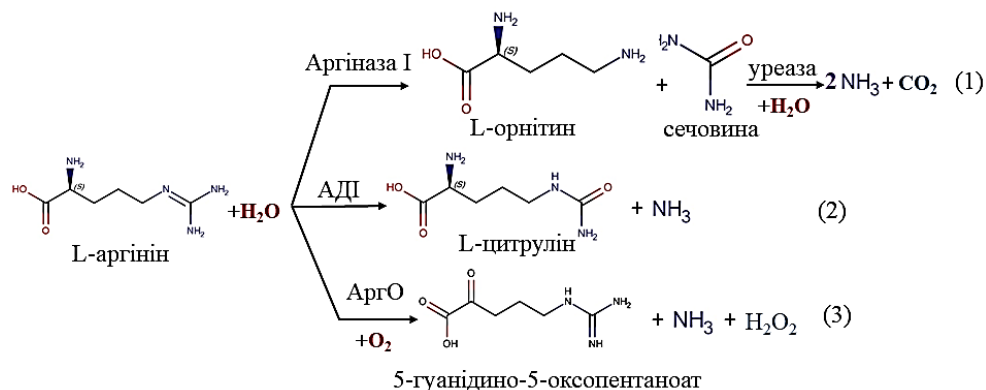


Рис. 9. Принципова схема ензиматичного розщеплення L-аргініну. Позначення: АДІ – аргініндеїміназа; АргО – аргініноксидаза.

Для розробки амперометричних біосенсорів для аналізу вмісту L-аргініну нами використано в ролі амоній-селективних нанохелаторів також НЧ CdCu та Cu із середнім розміром кристалітів 40 нм та 57 нм, відповідно. В ролі біоселективних елементів використано L-аргінін-гідролізуючі ензими – АргО, АДІ та аргіназу І (Табл. 2). Усі сконструйовані біоелектроди виявляють широкий лінійний діапазон (до 800 мкМ), задовільну стабільність при зберіганні (14 днів) і високу чутливість до L-аргініну: 1650, 1700 та $4500 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$ (для біосенсорів на основі АДІ, АргО та аргінази І /уреази, відповідно).

Таблиця 2

Порівняння робочих характеристик різних типів L-аргінін-чутливих амперометричних біосенсорів, сконструйованих за використання АргО, аргінази I та АДІ

Біоелектрод	Детектований продукт	Робочий потенціал, мВ	Чутливість, А·М ⁻¹ ·м ⁻²	Лінійний діапазон, мкМ	НМВ, мкМ	Джерело
АргО/Феноловий червоний	Н ₂ О ₂	—	—	100 – 1000	16	[Kumar et al., 2012, t www.scholar sresearchlibra ry. com]
АргО/CeCu/ ¹ CBE		–150	1630 ± 92	5 – 100	² Н.в.	Ця робота
АргО/NiPtPd/CBE			578 ± 5	10 – 250		
АргО/CuHCF/CBE			602 ± 42	10 – 100		
АДІ/ПАНі/Нафіон/Pt- ³ ЕТД	NH ₄ ⁺	–350	684±32	3 – 200	1,0	
ADI/Cu/Zn(Hg)S/ГЕ			1570	13 – 800	4,3	
аргіназа/уреаза/ПАНі/PtE			110 ± 1,3	70 – 600	38	
⁴ п-клітини/уреаза/ПАНі/PtE		–200	14 ± 1,1	до 600	Н.в.	
аргіназа-Au/п-клітини/уреаза/ПАНі/PtE			357 ± 24	10 – 700		
АргО/Cu/CBE		–300	2300 ± 15	2 – 18	0,7	
аргіназа-уреаза/Cu/CBE			780 ± 55	6 – 50	1,75	
аргіназа-уреаза/CdCu/CBE		–150	4500 ± 170	2–80	0,6	
АргО/CdCu/CBE			1700 ± 80	30–160	5,5	
АДІ/CdCu/CBE		–200	1650 ± 75	12–200	3,6	
АДІ/Cu/CBE		–300	665 ± 2	6 – 100	1,8	[Zhybak et al., 2017, doi 10.1007/s006 04-017-2290- 4]

Примітка: ¹CBE – скловуглецевий електрод; ²Н.в. – не визначали; ³ЕТД – електрод із трафаретним друком; ⁴п-клітини – пермеабілізовані клітини *O. polymorpha*.

Усі сконструйовані амперометричні біосенсиори використано для чутливого та високоселективного кількісного аналізу вмісту L-аргініну у комерційних соках та винах. Спостерігалася висока кореляція між вмістом L-аргініну, визначеним розробленими біонаносенсорами та ензиматичним референтним методом ($R = 0,993 - 0,999$). Отже, сконструйовані біосенсиори на основі ензимів у комбінації з наночастинками або полімерними мембранами можуть бути перспективними як для кількісного визначення вмісту L-аргініну у виноробстві для передбачення потенційних рівнів токсичного етилкарбамату (продукт мікробного розкладу L-Arg), так і для застосування в клінічній діагностиці.

На сьогодні, в галузі аналітичної біотехнології існує обмежена кількість даних щодо ензиматичних методів аналізу вмісту L-аргініну. Найперспективнішими для розробки таких методів є ензими метаболізму L-аргініну, зокрема аргіназа I, аргініндеїміназа, аргініноксидаза та аргініндекарбоксилаза. Існуючі комерційні тест-системи (виробництва фірм «Sigma», «Enzytec», «Elisa», «Megazyme» та ін.) є, переважно, мультиензимними зі спектрофотометричним (СФ) детектуванням кінцевого продукту реакції. Мультиензимні методи визначення L-аргініну мають низку недоліків, зокрема, неабсолютну селективність до цільового аналіту, спричинену позитивною реакцією на гуанідинові сполуки. Необхідність використання каскаду з кількох (3 – 5) ензимів і екзогенних кофакторів підвищує вартість методів та ускладнює процедуру аналізу (Табл. 3). На сьогодні тест-системи для моніторингу L-аргініну у біологічних рідинах, зокрема в крові, в арсеналі засобів вітчизняної клінічної діагностики відсутні. Нами створено два варіанти ензімо-флуоресцентного методу аналізу вмісту L-аргініну – моноензимний та двоензимний (Табл. 3). Принцип ензиматичних методів полягає в ензиматичному перетворенні L-аргініну і спектрофотометричному або флуорометричному детектуванню кольорової сполуки – кінцевого продукту хімічної реакції: карбаміду (за дії аргінази I), цитруліну (за дії АДІ) або амонію (за дії АДІ або аргінази I/уреази) із диметилмонооксимом (ДМО) або орто-фталевим альдегідом (ОФА). На основі цих принципів створено ензиматичний набір «Аргітест» для аналізу вмісту L-аргініну за використання препаратів термостабільної аргінази I чи АДІ, одержаних із сконструйованих нами штамів-надпродуцентів та очищених за власними технологіями, що суттєво знижує матеріальні затрати при виготовленні аналітичного набору. Як видно із Табл. 3 розроблені нами методи мають низку переваг, порівняно з існуючими аналогами, зокрема це висока селективність і чутливість та широкий діапазон тестованих концентрацій L-аргініну. Створені нами методи не потребують попереднього відокремлення L-аргініну з дослідного зразка, є простими у виконанні, високоселективними та надійними.

Усі розроблені ензиматично-хімічні методи успішно протестовано на зразках сироваток крові та харчових продуктів. У випадку аналізу вмісту L-аргініну в крові людини, ендогенну в сироватці сечовину усували обробкою комерційною уреазою. Показано, що кожен із досліджених ензимів може бути використаний як компонент ензиматичного набору «Аргітест». Оскільки препарати аргінази I та АДІ володіють високою стабільністю при зберіганні,

можна прогнозувати перспективність комерційного випуску ензиматичних наборів для аналізу вмісту L-Arg для практичних потреб. Пропонована розробка «Аргітест» відповідає рівню кращих зарубіжних прототипів.

Таблиця 3

Порівняльна характеристика створених ензиматично-хімічних методів аналізу вмісту L-аргініну

Метод	Ензим	Лінійний діапазон, мкМ	НМВ, мкМ	Джерело
ДМО-ФЛ, $\lambda = 360$ нм, $\lambda = 510$ нм	Аргіназа	0,28 – 280	0,15	Ця робота
ОФА-СФ, $\lambda = 362$ нм	Аргіназа-уреаза	0,9 – 60,0	0,85	
ОФА-ФЛ, $\lambda = 364$ нм, $\lambda = 425$ нм	Аргіназа-уреаза	0,09 – 6,0	0,06	
ОФА-ФЛ, $\lambda = 364$ нм, $\lambda = 415$ нм	АДІ	0,35 – 24	0,25	
ОФА-СФ, $\lambda = 340$ нм	АДІ	0,7 – 50	0,55	
Мультиензимний, СФ, $\lambda = 340$ нм	Аргіназа, уреаза, ¹ ГДГ	до 470	2,0	[Mira, 2001, doi: 10.1021/jf000522y]
Мультиензимний, СФ, $\lambda = 340$ нм	Аргіназа, уреаза, ГДГ	2,9 – 100	2,1	[https://www.nzytech.com/products-services/analytical-testkits/ak00171/]
Мультиензимний, СФ, $\lambda = 555$ нм	АДІ, ² АргС, ³ ПДК, піруватоксидаза, пероксидаза хрому	до 100	–	[Yasuhisa & Masafumi, 2014; doi: 10.1016/j.enzmiotec.2014.01.008]

Примітка: ¹ГДГ – глутаматдегідрогеназа; ²АргС – аргініносукцинат синтаза; ³ПДК – піруватфосфат дікіназа

Створено також ензиматично-флуориметричний метод для аналізу вмісту йонів деяких біометалів, зокрема, Mn^{2+} та Co^{2+} за використання апоензиму (His)₆–тагованої форми рекомбінантної аргінази І людини та ДМО. Для отримання апоензиму аргінази І, препарат ензиму попередньо діалізували у

присутності 1 мМ ЕДТА із наступним пропусканням через металозв'язуючий сорбент Chelex. Селективність аналізу вмісту йонів Mn^{2+} та Co^{2+} забезпечується оригінальним підходом – проведення рефолдингу та ензиматичної реакції при двох різних значеннях рН – оптимальних для двох металовмісних холоферментів аргінази I. Діапазон лінійності методу «апо-аргіназа-ДМО» у випадку аналізу вмісту Mn^{2+} становить від 4 пМ до 1,10 мкМ з межею виявлення 1 пМ Mn^{2+} , тоді як діапазон лінійності цього методу для аналізу вмісту йонів Co^{2+} становить від 8 пМ до 45 мкМ з межею виявлення 2,5 пМ. Розроблений метод апробовано для кількісного аналізу вмісту йонів Mn^{2+} та Co^{2+} у зразках стічних вод із шахт добування золота та міді. Встановлено високий рівень кореляції між ензиматичним та референтним методом – атомно-абсорбційна спектromетрія ($R = 0,998$). З огляду на високу чутливість, селективність, надійність і дешевизну запропонований метод може бути корисним для моніторингу вмісту Mn^{2+} і Co^{2+} у клінічних лабораторіях, харчовій промисловості та службах екологічного контролю.

У восьмому розділі описано розробку амперометричних біо(хемо)сенсорів та тест-наборів за використання рекомбінантної креатиніндеїмінази (КДІ) для кількісного аналізу вмісту креатиніну. Значну увагу в роботі присвячено дослідженню фізико-хімічних та каталітичних властивостей рекомбінантної КДІ та створенню на її основі нових біоаналітичних систем. Проведено клонування гена *codA* *S. glutamicum* на векторах індуктивних систем експресії з включенням у структуру рекомбінантного білка (His)₆-фрагмента та S-пептиду рибонуклеази А. Сконструйовано рекомбінантний надпродуцент КДІ на основі клітин *E. coli* з продуктивністю щодо КДІ 20-50 мг/л культури. Опрацьовано одноетапний метод очищення рекомбінантного ензиму з використанням метало-афінної хроматографії та отримано високо очищений препарат КДІ з питомою активністю 22 мкмоль·хв⁻¹·мг⁻¹·білка. Проведено фізико-хімічну та ензимологічну характеристику ензиму, зокрема, визначено молекулярну масу субодиниці (46,3 кДа), вивчено температурний та рН-профіль активності, досліджено термо- та рН-стабільність ензиму, а також його кінетичні параметри ($k_{\text{cat}} = 7,15 \text{ с}^{-1}$; $K_M = 1,96 \text{ мМ}$ відносно креатиніну). Показано, що рекомбінантна КДІ є термостабільним білком, має високий температурний оптимум (75 °С) і стійка у широкому діапазоні рН (6,0–10,5). Виявлено, що рекомбінантна КДІ *S. glutamicum* має строгу субстратну специфічність до креатиніну, що вигідно відрізняє цей ензим від аналогічних мікробних ензимів.

Проведено дослідження з конструювання амперометричного біосенсора для кількісного визначення вмісту креатиніну за використання КДІ та амоній-селективних наночастинок Cu/Zn(Hg)S. Створений біосенсор характеризується високою селективністю та чутливістю до креатиніну (2660 А·М⁻¹·м⁻²). Лінійний діапазон біосенсора спостерігається в діапазоні від 1,5 мкМ до 50 мкМ із нижньою межею визначення креатиніну 0,45 мкМ (Табл. 4).

Таблиця 4

Характеристики створених амперометричних біосенсорів на основі рекомбінантної КДІ

Тип біосенсора	Детектований продукт	Робочий потенціал, мВ	Чутливість, $A \cdot M^{-1} \cdot m^{-2}$	Лінійний діапазон, мкМ	НМВ, мкМ	K_M^{poz} , мМ
КДІ/ Cu/Zn(Hg)S [Ця робота]	NH_4^+	+170	2660	1,5 – 50	0,45	0,04
КДІ/ПАНі/Cu [Zhybak <i>et al.</i> , 2016, DOI: 10.1016/j.bios.2015.10.009]		–350	850	до 125	0,5	0,163
КДІ/CoCu/ ¹ СВЕ [Ця робота]	⁴ N-МГ	–0.05	195	10 – 800	0,5	3,8
CoCl ₂ / ⁶ MC/ КДІ/ ² ГЕ [Dasgupta <i>et al.</i> , 2020; https://doi.org/10.1039/D0RA06470J]		–1,4 ⁵	³ Н.в.	0,71 – 3550	Н.в.	Н.в.
CoCl ₂ / КДІ/ ² ГЕ [Dasgupta <i>et al.</i> , 2020; https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02997]		–1,4 ⁵	Н.в.	0,17 – 3530	Н.в.	Н.в.

Примітка: ¹СВЕ – скловуглецевий електрод; ²КЕ – карбоновий електрод; ³Н.в. – не визначали; ⁴N-МГ – N-метилгідантоїн; ⁵Класичні хроноамперометричні дослідження при вибраному робочому потенціалі не проводили.

Розроблений прототип біосенсора адаптовано для використання у складі дослідного зразка амперометричного аналізатора, сумісного з планшетом розробленого у співпраці з к.т.н. Вусом Б.С., ТзОВ «Науково-виробнича фірма «Інженерна Лабораторія» (Львів, Україна) у межах комплексної науково-технічної програми: «Розумні» сенсорні прилади нового покоління на основі сучасних матеріалів та технологій» (Рис. 10). Тестування біосенсорної системи проводили на зразках біологічних рідин людини (сироватки крові та поті) у відділі біохімії крові ДУ «Інститут патології крові та трансфузійної медицини НАМН України».



Рис. 10. Загальний вигляд портативного креатинінового аналізатора, сумісного із планшетом Microsoft Lenovo Mix 320.

Прямий аналіз креатиніну у біологічних рідинах має вирішальне значення для належного лікування захворювань нирок, особливо для пацієнтів, які на гемодіалізі або проходять терапію з трансплантації нирки. Однак наявність ендogenous аміаку в крові значно ускладнює рутинний аналіз і вимагає додаткового аналізу вмісту аміаку або попередньої обробки зразка для видалення наявного аміаку. Нами створено амперометричний біосенсор на основі рекомбінантної бактерійної КДІ та наночастинок CoCu для прямого аналізу вмісту креатиніну у біологічних рідинах. Принцип методу ґрунтується на амперометричній детекції N-метилгідантоїну (N-МГ) – кінцевого продукту гідролізу креатиніну під дією КДІ (Рис. 11 а). Досліджено фізико-хімічні характеристики розроблених амперометричних біоелектродів, селективних до креатиніну. Результати хроноамперометричного дослідження відклику біосенсора з архітектурою селективного шару КДІ-нCoCu/CBE на внесений креатинін зображено на Рис. 11 б.

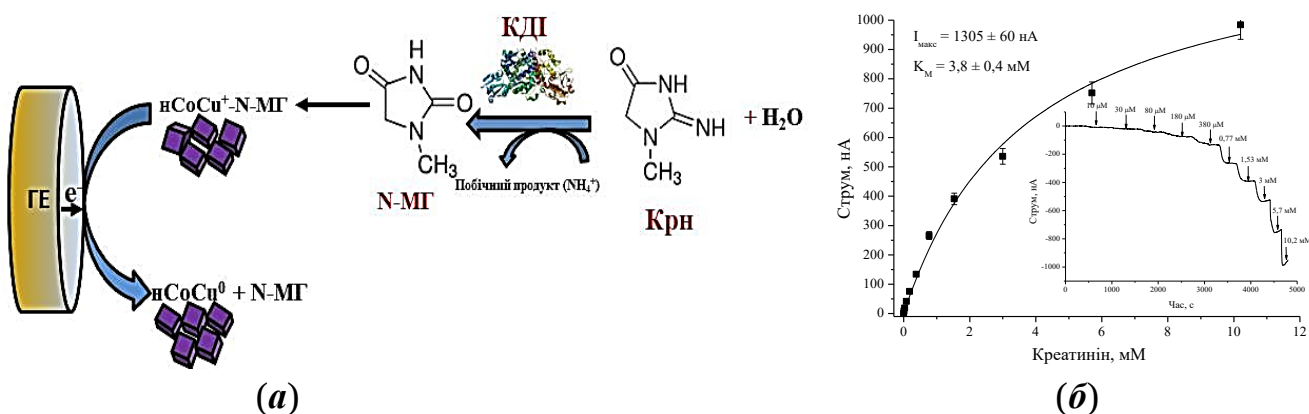


Рис. 11. Принципова схема функціонування амперометричного біосенсора на основі КДІ та НЧ CoCu (а). Позначення: N-МГ – N-метилгідантоїн, Крн – креатинін, ГЕ – графітовий електрод. Калібрувальні криві відклику на креатинін (б). Умови: робочий потенціал -50 мВ проти Ag/AgCl у 50 мМ ФБ, рН $7,5$. Площа робочого електроду $1,7$ мм².

Розроблений біосенсор не потребує видалення ендogenous аміаку із тестованих зразків та характеризується високою селективністю до цільового аналіту. Він характеризується низьким робочим потенціалом (-50 мВ), швидкою реакцією на аналіт (20 с), широким лінійним діапазоном ($0,01$ – $0,8$ мМ), достатньою чутливістю ($195 \text{ А} \cdot \text{М}^{-1} \cdot \text{м}^{-2}$) та низькою межею виявлення ($0,5$ мкМ) (Табл. 4). Крім того, нами з'ясовано хімічний склад та структуру комплексу CoCu–N-МГ і механізм детектування креатиніну. Використовуючи метод множинного додавання стандарту, розроблений CoCu/КДІ-функціоналізований електрод протестовано для аналізу вмісту креатиніну в реальних біологічних рідинах людини (сеча та сироватка крові). Виявлено високу кореляцію між отриманими аналітичними результатами та референтним методом. Отже, створений лабораторний прототип креатинін-селективного біосенсора є перспективним для рутинного клінічного аналізу.

Нами розроблено високочутливий ензиматично-флуориметричний метод аналізу вмісту креатиніну за використання рекомбінантної КДІ та *o*-фталевого альдегіду (ОФА). Цей метод базується на низці реакцій (Рис. 12). На першій стадії реакції, за каталізу КДІ відбувається гідроліз креатиніну до *N*-метилгідантоїну та амонію (Рис. 12). Утворений амоній взаємодіє з ОФА у присутності сульфіту, утворюючи *2H*-ізоіндол-1-тіол. Продукт реакції кількісно оцінюють спектрофотометрично (СФ-метод) або флуориметрично (ФЛ-метод). Порогова чутливість запропонованого методу становить 6 мкМ (для СФ-методу) та $0,2$ мкМ (для ФЛ-методу).

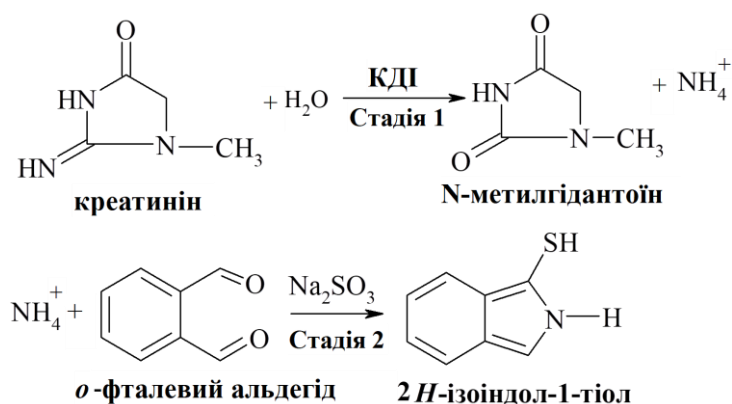


Рис. 12. Схема реакцій визначення вмісту креатиніну ензиматично-хімічним методом.

Проведено оптимізацію одночасного аналізу вмісту креатиніну та аміаку в сироватках крові людини. Параметрами оптимізації служили концентрації КДІ, ОФА, ЕДТА, тип буферної системи, спосіб підготовки проб для аналізу. Порівняльний аналіз результатів визначення вмісту креатиніну в зразках сироватки крові пацієнтів із порушеною функцією нирок до та після проведення гемодіалізу розробленими біосенсорним на ензиматично-флуориметричними методами показав високий рівень кореляції аналітичних даних ($R = 0,998$), що свідчить про надійність і точність новостворених підходів. Розроблений креатинін-селективний біосенсор переважає відомі аналоги, перш за все, за використаним низьким робочим потенціалом, вищою чутливістю та коротшою тривалістю аналізу. Розроблені

біосенсиори на основі рекомбінантної КДІ успішно апробовано для одночасного аналізу вмісту креатиніну та амонію в реальних зразках сироватки крові людини.

Отже, у роботі використано тісне поєднання класичних мікробіолого-біохімічних досліджень, генетичної інженерії та сучасних нанотехнологій з метою створення нових селективних біоаналітичних методів на основі мікробних ензимів та синтезованих нанозимів для кількісного аналізу практично важливих аналітів. Проведено верифікацію створених біосенсорних та ензиматичних підходів порівняно з традиційними методами аналізу та показано високий рівень кореляції аналітичних результатів. На Рис. 13 зображено узагальнену схему основних етапів і здобутків дисертаційної роботи, яка описує синтез нанозимів, отримання мікробних ензимів, іммобілізацію біологічного матеріалу на поверхні електрохімічних перетворювачів і розробку протоколів аналізу модельних та реальних об'єктів. Варто зазначити, що важливим здобутком дисертаційної роботи є перший у світовій науковій практиці експериментальний доказ, що штучно синтезовані нанозими ("катазими") можуть повноцінно замінити *in vivo* природний ензим – каталазу, відновивши здатність мутантних безкаталазних клітин метилотрофних дріжджів рости у середовищі, що містить метанол.

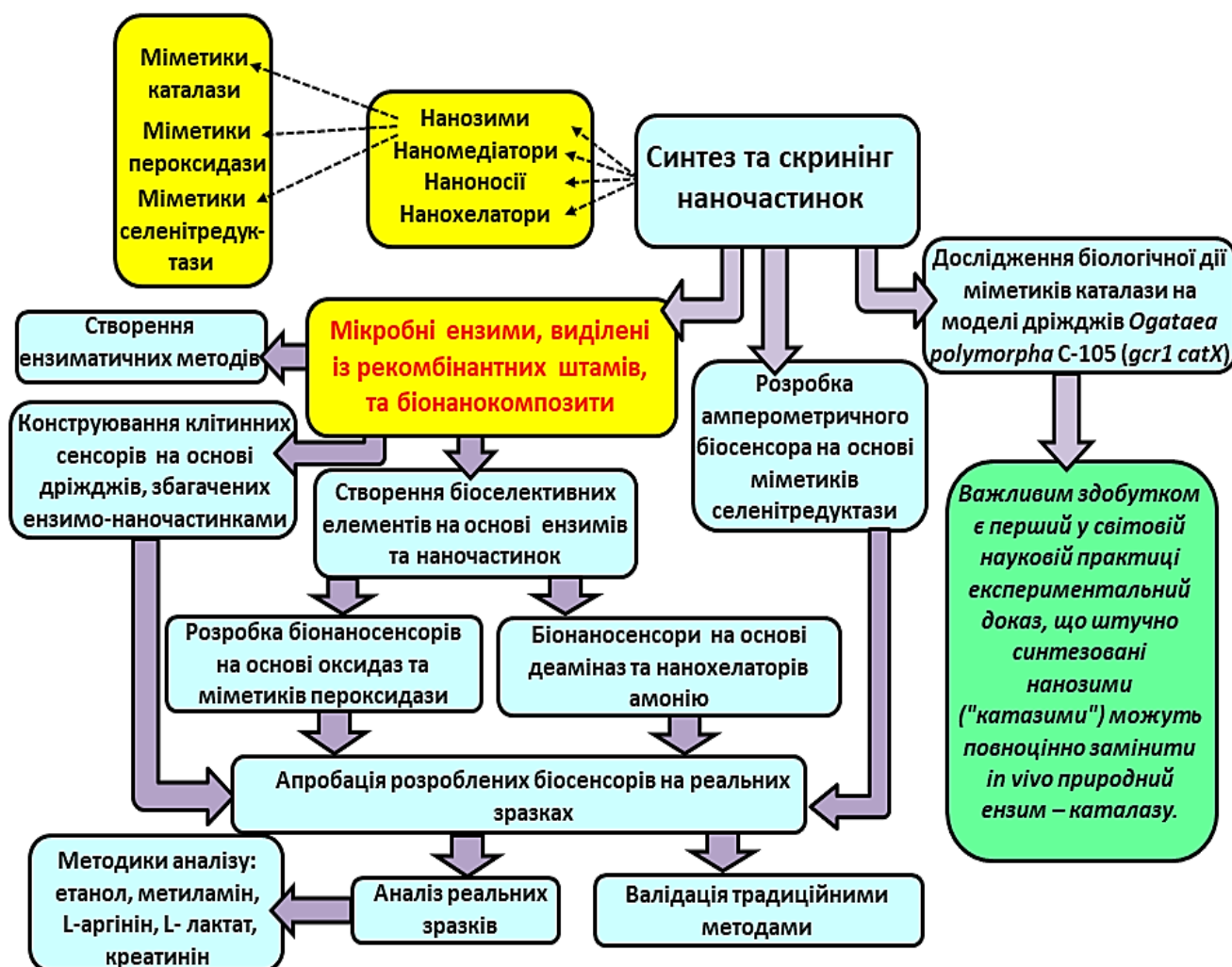


Рис. 13. Узагальнена схема основних етапів та здобутків дисертаційної роботи із застосування ензимів та нанозимів для створення нових біоаналітичних методів визначення практично важливих аналітів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено результати комплексного дослідження структурних, фізико-хімічних та каталітичних властивостей нанозимів та поєднання їх з мікробними ензимами, а також вивчення біологічної та можливої токсичної дії (*in vivo*) нанозимних композитів на клітини дріжджів *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. Досліджено кон'югацію наноматеріалів із мікробними ензимами та створено на їх основі нові біо(хемо)наносенсиори та тест-набори для визначення практично важливих аналітів, зокрема, креатиніну, L-аргініну, глюкози, етанолу та метиламіну.

Основні наукові та практичні результати роботи викладено у наступних висновках:

1. Проведено синтез та скринінг нових наноматеріалів на каталітичну, нанозимну активність. Здійснено структурно-морфологічну характеристику нанозимів (НЗ). Встановлено, що розмір отриманих матеріалів із каталітичною активністю знаходиться в межах від 15 нм (НЗ) до 5 мкм (мікрозими, МЗ). Проведено аналіз синтезованих НМ на псевдоензиматичну активність – пероксидазну, каталазну та редуктазну. Досліджено каталітичні властивості та субстратну специфічність отриманих НЗ.

2. Вивчено цитотоксичну дію синтезованих НЗ на клітини метилотрофних дріжджів за впливом на швидкість росту та виживання клітин за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Показано, що НЗ (у концентрації 0,1 мг/мл у середовищі) проявляють різний цитотоксичний вплив на клітини дріжджів *Ogataea (Hansenula) polymorpha*: «катазими» знижують виживання клітин в 2,6–4,5 рази, тоді як НЗ з пероксидазною активністю дещо підвищують цей показник.

3. Встановлено, що поглинання безкаталазними клітинами «катазимів» відновлює здатність мутантних клітин рости у середовищі, що містить метанол. Активність НЗ забезпечує розщеплення надмірної кількості гідроген пероксиду, що утворюється внаслідок росту клітин у середовищі з метанолом, усуваючи його токсичну дію на клітини. Вірогідно, це перший у науковій практиці експериментальний доказ можливості заміни природного ензима нанозимом *in vivo*.

4. Отримані НЗ із редуктазною активністю протестовано на антиоксидантну активність відносно вільних радикалів АБТС^{•+} та DPPH[•] у порівнянні із Тролоксом. Найактивніші редуктазні НЗ використано для конструювання амперометричного біосенсора для аналізу вмісту селеніту. Сконструйований біосенсор характеризується високою чутливістю ($1700 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) та широким лінійним діапазоном (від 16 мкМ до 1 мМ) щодо селеніту.

5. Сконструйовано амперометричні біосенсиори на основі різних мікробних оксидаз та НЗ, які володіють пероксидазною активністю. Створені біоелектроди використано для аналізу вмісту етанолу, метиламіну та L-аргініну. Розроблені моноензимні біосенсиори показали покращені аналітичні характеристики, порівняно з відповідними біензимними амперометричними електродами, що містять природну ПО. Встановлено, що після модифікації поверхні електроду НЗ nCuCe чутливість зростає від 4 до 18 разів для графітового електроду, покритого метиламінооксидазою та шаром nCuCe/порAu.

6. Синтезовано нові метал-гібридні наноматеріали, селективні до йонів амонію. Розроблено чутливі та селективні амперометричні біосенсиори для кількісного аналізу вмісту L-аргініну та креатиніну на основі мікробних деаміназ та наночастинок. В основі запропонованих біосенсорних методів лежить застосування термостабільної аргініндеімінази (АДІ), аргінази I/уреази або креатиніндеімінази (КДІ) у поєднанні з амоній-селективними наноматеріалами. Створені амперометричні біосенсиори характеризуються високою селективністю та чутливістю до цільових аналітів, а також задовільною операційною стабільністю.

7. Уперше розроблено амперометричний біосенсор для аналізу вмісту L-аргініну на основі пермеабілізованих клітин штаму-надпродуцента рекомбінантної аргінази I людини *O. polymorpha* NCYC 495 у комбінації із комерційною уреазою і електроосадженого поліаніліну та досліджено його фізико-хімічні характеристики. Біосенсор відзначається високою селективністю, достатньою чутливістю до L-аргініну ($14 \pm 1,2 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) та широким діапазоном лінійності (до 0,6 мМ).

8. Уперше розроблено чутливі та селективні ензиматичні методи кількісного аналізу вмісту L-аргініну із флуоресцентним та спектрофотометричним способом детектування кольорового продукту реакції за допомогою о-фталевого альдегіду. Методи базуються на використанні високоочищених препаратів аргінази I або аргініндеімінази. Запропоновані методи є простими та швидкими у виконанні у порівнянні з відомими ензиматичними підходами і дозволяють підвищити точність визначення вмісту L-аргініну за рахунок високої селективності цільових ензимів та їх термостабільності.

9. На моделі високоочищеної Манганзалежної рекомбінантної аргінази I людини, отриманої з клітин рекомбінантних дріжджів *O. polymorpha*, вперше проведено дослідження по отриманню препаратів апоензиму, позбавленого металу, та реконструкції холоензиму. Вперше розроблено новий ензиматичний метод на основі апоензиму аргінази I та 2,3-бутандіонмонооксиму для кількісного визначення йонів Mn^{2+} та Co^{2+} . Запропонований метод характеризується надзвичайно високою чутливістю до йонів Mn^{2+} та Co^{2+} – 1 пМ та 2,5 пМ, відповідно.

10. Розроблено амперометричний біосенсор для аналізу вмісту креатиніну за використання рекомбінантної КДІ та НЧ CoCu, чутливих до N-метилгідантоїну. Вперше ідентифіковано структуру утвореного комплексу CoCu-N-метилгідантоїн. Створений біосенсор відзначається високою селективністю, хорошою чутливістю до креатиніну ($200 \pm 1,2 \text{ A} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$) та широким діапазоном лінійності (10 мкМ – 0,4 мМ).

11. Проведено конструювання та тестування мініатюризованого мікрострумового потенціостата, сумісного з сучасними гаджетами. Прилад адаптовано під використання комерційних планарних електродів, модифікованих рекомбінантною КДІ.

12. Розроблені біоаналітичні підходи на основі рекомбінантних клітин та очищених ензимів використано для кількісного аналізу вмісту L-аргініну, етанолу, метиламіну та креатиніну в реальних зразках біологічних рідин людини, харчових продуктів, фармацевтичних препаратів трансфузійного призначення та стічних

водах. Завдяки високій чутливості та селективності, а також надійності та простоті у використанні, опрацьовані ензиматичні та біосенсорні підходи аналізу вмісту цільових аналітів можуть знайти практичне використання в клінічній діагностиці, медицині та харчових технологіях.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, що розкривають основні наукові результати дисертації:

- 1) **Stasyuk N**, Zakalskiy A, Nogala W, Gawinkowski S, Ratajczyk T, Bonarowska M, Demkiv O, Zakalska O, Gonchar M (2023) A reagentless amperometric biosensor for creatinine assay based on recombinant creatinine deiminase and N-methylhydantoin-sensitive CoCu nanocomposite. *Sensors and Actuators B: Chemical* 393: 34276. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2023.134276>. [IF 8,4; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*)
- 2) Prokopiv T, **Stasyuk N**, Gonchar M (2023) Nanozyme can substitute a natural *Ogataea polymorpha* catalase enzyme in vivo. *Microchimica Acta* 190(5): 174. doi: 10.1007/s00604-023-05753-8 [IF 5,7; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*)
- 3) **Stasyuk N**, Demkiv O, Gayda G, Zakalska O, Nogala W, Gonchar M (2022) Amperometric biosensors based on alcohol oxidase and peroxidase-like nanozymes for ethanol assay. *Microchimica Acta* 189: 474. [IF 5,7; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05568-z> (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, синтез та скринінг нанозимів на псевдопероксидазну активність і конструювання біосенсорів, написання рукопису та підготовка статті до друку*)
- 4) **Stasyuk N**, Gayda G, Kavetsky T, Gonchar M (2022) Nanozymes with reductase-like activities: electrochemical and antioxidant properties. *RSC Advances* 12: 2026 – 2035. doi: 10.1039/d1ra08127f [IF 4,04; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*)
- 5) **Stasyuk N**, Demkiv O, Gayda G, Zakalska O, Zakalskiy A, Serkiz R, Kavetsky T, Gonchar M (2022) Reusable alcohol oxidase-nPtCu/alginate beads for highly sensitive ethanol assay in beverages. *RSC Advances* 12: 21309 – 21317. doi: 10.1039/d2ra02106d [IF 4,04; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*).
- 6) **Stasyuk N**, Demkiv O, Gayda G, Zakalskiy A, Klepach H, Bisko N, Gonchar M, Nisnevitch M (2022) Highly Porous 3D Gold Enhances Sensitivity of Amperometric Biosensors Based on Oxidases and CuCe Nanoparticles. *Biosensors* 12: 472. doi: 10.3390/bios12070472 [IF 5,4; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (*Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку*).
- 7) **Stasyuk NYe**, Gayda GZ, Zakalskiy AE, Fayura LR, Zakalska OM, Sibirny AA,

Nisnevitch M, Gonchar MV (2022) Amperometric biosensors for L-arginine and creatinine assay based on recombinant deiminases and ammonium-sensitive Cu/Zn(Hg)S nanoparticles. *Talanta* 238 (1): 122996, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122996> [IF 6,1; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку).

8) **Stasyuk N**, Gayda G, Demkiv O, Darmohray L, Gonchar M, Nisnevitch M (2021) Amperometric biosensors for L-arginine determination based on L-arginine oxidase and peroxidase-like nanozymes. *Applied Sciences* 11(15): 7024. <https://doi.org/10.3390/app11157024> [IF 2,7; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (Дисертантка спільно зі співавторами провела дослідження, взяла участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації).

9) Demkiv O, **Stasyuk N**, Serkiz R, Gayda G, Nisnevitch, M, Gonchar M (2021) Peroxidase-Like Metal-Based Nanozymes: Synthesis, Catalytic Properties, and Analytical Application. *Applied Science* 11: 777. <https://doi.org/10.3390/app11020777> [IF 2,7; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (Дисертантка спільно зі співавторами провела дослідження, взяла участь в аналізі отриманих даних, написанні та оформленні публікації).

10) Zakalskiy A, **Stasyuk N**, Zakalska O, Boretsky Y, Gonchar M (2020) Overexpression and one-step renaturation-purification of the tagged creatinine deiminase of *Corynebacterium glutamicum* in *Escherichia coli* cells. *Cell Biology International* 44 (5), 1204–1211 [IF 3,612; SCOPUS, WoS; SCImago – Q3] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32039507/> (Дисертантка спільно із співавторами провела ензимологічні дослідження ензиму та статистичну обробку результатів, взяла участь у написанні та оформленні публікації).

11) **Stasyuk N**, Gayda G, Zakalskiy A, Zakalska O, Serkiz R, Gonchar M (2019) Amperometric biosensors based on oxidases and PtRu nanoparticles as artificial peroxidase. *Food Chemistry* 285: 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.117> [IF 6,306; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (Особистий внесок здобувача: концептуалізація, планування і виконання експериментів, написання рукопису та підготовка статті до друку)

12) **Stasyuk N**, Gayda G, Zakalskiy A, Zakalska O, Errachid A, Gonchar M (2018) Highly selective apo-arginase based method for sensitive enzymatic assay of manganese (II) and cobalt (II) ions. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 193, 349 – 356. doi: 10.1016/j.saa.2017.12.031. [IF 2,931; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (Особисто дисертанткою підготовлено дизайн дослідження, проведено аналіз і обговорення отриманих результатів та написано статтю).

13) **Stasyuk N**, Gayda G, Yepremyan H, Stepien A, Gonchar M (2017) Fluorometric enzymatic assay of L-arginine. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 193 170: 184-190. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.07.019> [IF 2,931; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, проведено аналіз і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

14) **Stasyuk N**, Gayda G, Zakalskiy A, Zakalska O, Fayura L, Vovk O, Stasyk O, Sibirny A, Gonchar M (2017) Recombinant Forms of Arginase and Arginine Deiminase as

Catalytic Components of Argitest Enzymatic Kit. Science and Innovation 13(4): 56—63. [фахове видання України] [http://scinn-eng.org.ua/archive/13\(4\)/13\(4\)06](http://scinn-eng.org.ua/archive/13(4)/13(4)06) (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

15) **Stasyuk N**, Gayda G, Klepach H, Semashko T, Gonchar M (2017) Nanoparticles of Noble Metals for Enzymatic Sensors: An Amperometric Glucose Biosensor for Wine Analysis. Sensors Letters 15(8), 647 – 654. <https://doi.org/10.1166/sl.2017.3862> (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

16) **Stasyuk N**, Gayda G, Fayura L, Boretsky Y, Gonchar M, Sibirny A (2016) Novel arginine deiminase-based method to assay L-Arginine in beverages. Food Chemistry 201: 320-326. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.093> [IF 4,529; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, проведено аналіз і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

17) **Stasyuk N**, Gayda G, Serkiz RJa, Gonchar M (2016) The “green” synthesis of gold nanoparticles by the yeast *Hansenula polymorpha*. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 73: 96 – 102. [фахове видання України] http://nbuv.gov.ua/UJRN/VLNU_biol_2016_73_18 (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

18) **Stasyuk N**, Gayda G, Klepach H, Gonchar M (2016) Nanoparticles of noble metals as effective platforms for the fabrication of amperometric biosensor on hydrogen peroxide. Sensors Letters 14: 1169 – 1179 <https://doi.org/10.1166/sl.2016.3748>. (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

19) Karkovska M, Smutok O, **Stasyuk N**, Gonchar M (2015) L-Lactate-selective microbial sensor based on flavocytochrome b₂-enriched yeast cells using recombinant and nanotechnology approaches, Talanta 144, 1195–1200. [IF 4,035; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (Особисто дисертанткою проведено синтез наночастинок та проведено іммобілізацію ФЦ b₂ на поверхні наноматеріалів, обговорення отриманих результатів та формулювання висновків, написання статті).

20) **Stasyuk NYe**, Bass S. R., Gayda G. Z., Yepremyan H. S., Gonchar MV (2015) New enzymatic method for L-arginine assay based on human arginase I and urease. ScienceRise 6 (1), 43-48. [фахове видання України] <https://journals.urau.ua/sciencerrise/article/view/45126> (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

21) **Stasyuk NYe**, Gayda GZ, Serkiz RJa, Gonchar MV (2015) Cell Imaging with Fluorescent Bi-Metallic Nanoparticles. Journal of Advances in Chemistry 11 (4): 3499 – 3511. <https://rajpub.com/index.php/jac/article/view/6694> (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

22) **Stasyuk N**, Gayda G, Gonchar M (2014) L-arginine-selective microbial amperometric sensor based on recombinant yeast cell over-producing human liver arginase I. Sensors

and Actuators B: Chemical 204: 515-521. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.06.112> [IF 4,589; SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] (Особисто дисертантом запропоновано ідею дослідження, проведено аналіз і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті)

23) **Stasyuk NYe**, Smutok OV, Zakalskiy AE, Zakalska OM, Gonchar MV (2014) Methylamine-sensitive amperometric biosensor based on (His)₆-tagged *Hansenula polymorpha* methylamine oxidase immobilized on the gold nanoparticles. BioMed Research International 2014: 1-8. doi: 10.1155/2014/480498 [IF 2,239; SCOPUS, WoS; SCImago – Q2] (Особисто дисертанткою проведено конструювання амперометричних біосенсорів на основі метиламінооксидази та апробація отриманих сенсорів на реальних зразках, обговорення отриманих результатів та формулювання висновків, написання статті).

24) Synenka MM, **Stasyuk NYe**, Semashko TV, Gayda GZ, Mikhailova RV, Gonchar MV (2014) Immobilization of oxidoreductases at/on gold and silver nanoparticles. Studia Biologica 8 (3-4): 5–12. [фахове видання України] <http://publications.lnu.edu.ua/journals/index.php/biology/article/view/192> (Особисто дисертанткою проведено аналізування і обговорення отриманих результатів, формулювання висновків та написання статті).

Патенти:

1. Патент України на корисну модель №142490 Україна, МПК G01N21/64 Моноензиматичний спосіб визначення вмісту креатиніну та амонію в біологічних рідинах людини / Гончар М.В., Закальський А.Є., Закальська О.М., **Стасюк Н.Є.**, Прокопів Т.М., Борецький Ю.Р., Демків О.М.; заявник і власник Інститут біології клітини НАН України, Львівський державний університет фізичної культури імені Івана Боберського – № u201911544, заявл. 29.11.2019, опубл. 10.06.2020, Бюл. №11. – 8 с. [патент України на корисну модель] (Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання і підготовка тексту патенту).

2. Патент України на корисну модель №107543 Україна, МПК G01N 21/64 Ензиматичний метод визначення L-аргініну в крові людини / **Стасюк Н.Є.**, Гайда Г.З., Закальський А.Є., Закальська О.М., Гончар М.В.; заявник і власник Інститут біології клітини НАН України – № u201512716, заявл. 22.12.2015, опубл. 10.06.2016, Бюл. №11. – 5 с. [патент України на корисну модель] (Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання і підготовка тексту патенту).

3. Патент на корисну модель №108773 Україна, МПК G01N 33/52, G01N 21/64 Ензиматично-хімічний метод визначення вмісту L-аргініну в харчових продуктах та алкогольних напоях / **Стасюк Н.Є.**, Гайда Г.З., Фаюра Л.Р., Борецький Ю.Р., Сибірний А.А., Гончар М.В.; заявник і власник Інститут біології клітини НАН України – № u201601804, заявл. 25.02.2016, опубл. 25.07.2016, Бюл. №14. – 7 с. [патент України на корисну модель] (Особистий внесок здобувача: виконання експериментів, написання і підготовка тексту патенту).

Розділи монографій:

1. Gayda G, **Stasyuk N**, Zakalskiy A, Gonchar M, Katz E (2022) Arginine-hydrolyzing enzymes for electrochemical biosensors. Current Opin Electrochem. 33: 100941 [IF 8,5;

SCOPUS, WoS; SCImago – Q1] <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2451910322000060> (Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано частину розділу «Електрохімічні біосенсиори для аналізу L-аргініну»).

2. **Stasyuk N.**, Smutok O, Demkiv O, Prokopiv T, Gayda G, Nisnevitch M, Gonchar M. (2020) Synthesis, Catalytic Properties and Application in Biosensorics of Nanozymes and Electronanocatalysts: A Review. *Sensors*, 20 (16): 4509 [IF 3,847; **SCOPUS, WoS; SCImago – Q1]** <https://www.mdpi.com/1424-8220/20/16/4509> (Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділ 2 «Методи синтезу каталітичних наноматеріалів» і розділ 3 «Каталітичні властивості нанозимів»).

3. Zakalskiy A., **Stasyuk N.**, Gonchar M. (2019) Creatinine Deiminase: Characterization, Using in Enzymatic Creatinine Assay, and Production of the Enzyme. *Curr Protein Pept Sci*. 20: 465-470 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30426898/> [IF 2,52; **SCOPUS, WoS; SCImago – Q2]** (Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділ 3 «Хімічні та фізико-хімічні методи для аналізу креатиніну»).

4. Gayda G, **Stasyuk N.**, Serkiz R, Gonchar M. Fluorescent nanoparticles of noble metals for cell imaging (ред. Н.А.Серебрякова). Київ: НВП «Видавництво «Проект наукова книга»; 2017. С. 156 – 165. <http://ir.librarynmu.com/handle/123456789/7658> (Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано частину розділу 4.3 «Дослідження цитотоксичності наноматеріалів на клітини дріжджів»).

5. Карковська М, **Стасюк Н.**, Гайда Г., Смуток О., Гончар М. Наноматеріали у конструюванні біосенсорів медичного призначення (ред. Н.А.Серебрякова). Київ: НВП «Видавництво «Проект наукова книга»; 2017. С. 165 – 177. <http://ir.librarynmu.com/handle/123456789/7658> (Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділ 4.4 «Наноматеріали у конструюванні біосенсорів біомедичного призначення»).

6. Gonchar M, Smutok O, Karkovska M, **Stasyuk N.**, Gayda G. Yeast-based biosensors for clinical diagnostics and food control (Ed. A.A. Sibirny). Springer International Publishing AG "Biotechnology of Yeasts and Filamentous Fungi"; 2017. P. 392 – 400. <https://dokumen.pub/non-conventional-yeasts-from-basic-research-to-application-1st-ed-2019-978-3-030-21109-7-978-3-030-21110-3.html> (Особисто дисертанткою проведено аналізування даних літературних джерел та написано розділ 14.3.2 «Аналіз амінокислот»).

Список тез доповідей на конференціях, з'їздах та симпозіумах, на яких апробовано результати дисертації

1. Gayda G., Klepach H., **Stasyuk N.**, Ivash N., Bilek M., Broda D., Gonchar M. Application of recombinant glycerol dehydrogenase for glycerol assay in wines. 5 th Polish-Ukrainian Weigl Conference on Microbiology: abstracts, Chernivtsi, 23-25 May, 2013. Chernivtsi, Ukraine, 2013. P. 72.

2. Gonchar M., **Stasyuk N.**, Zakalskiy A., Smutok O., Zakalska A., Gaida G. Assay of arginine and manganese by amperometric biosensors based on the recombinant human

arginase and its apo-enzyme. IX Jakub K. Parnas Conference “Proteins from Birth to Death”: abstracts, Jerusalem, Israel, 29 September – 2 October, 2013. Jerusalem, Israel, 2013. P. 97.

3. Zakalskiy A., Gayda G., **Stasyuk N.**, Zakalska O., Smutok O., Gonchar M. Biosensor for assay of manganese ions using apoenzyme of Mn^{2+} -dependent recombinant arginase I. International Workshop “Recent advances in Micro/Nano Sensors for Mono- and Multi-Target assays”: abstracts, Kyiv, Ukraine, 19-23 May, 2013. Kyiv, Ukraine, 2013. P. 71-72.

4. **Stasyuk N.**, Gayda G., Gonchar M. L-arginine-selective microbial amperometric sensor based on recombinant yeast cell over-producing human liver arginase I. International Symposium on Cell Biology jointly with 4rd Ukrainian Congress for Cell Biology: abstracts, Uzhhorod, Ukraine, 17 – 20 September, 2014. Uzhhorod, Ukraine, 2014. P. 19.

5. **Stasyuk N.**, Gayda G., Gonchar M. New bioanalytical methods based on arginase I for L-arginine assay. 5th International Young Scientists Conference “Human-Nutrition-Environment” “Biotechnology for sustainable development”: abstracts, Rzeszow, Poland. 24 – 25 April, 2014. Rzeszow, Poland. P. 78.

6. **Stasyuk N.**, Gayda G., Gonchar M. Arginase-based bioanalytical approaches to L-arginine assay for prediction of urethane formation in fermented foods. International Scientific Conference "Microorganisms in detoxification of heavy metals and xenobiotics": abstracts, Krasiczyn, Poland. 28 September – 1 October 2014. Krasiczyn, Poland. P. 15.

7. Gonchar M., Karkovska M., **Stasyuk N.**, Smutok O. Gene and Protein Engineering in Production of the Enzymes of Analytical Importance. 27th International conference on yeast genetics and molecular biology: abstracts, Levico Terme, Italy, 6–12 September 2015. Levico Terme, Italy. P. 153.

8. Karkovska M., Smutok O., **Stasyuk N.**, Gonchar M. L-lactate-selective microbial sensor based on flavocytochrome b_2 -enriched yeast cells using recombinant and nanotechnology approaches. International conference "Advances in Cell Biology and Biotechnology": abstracts, Lviv, Ukraine, 11–13 October, 2015. Lviv, Ukraine. P. 69.

9. **Stasyuk N.**, Gayda G., Klepach H., Gonchar M. Nanoparticles of Noble metals as effective platforms for the fabrication of amperometric biosensors on hydrogen peroxide. International Symposium on Cell Biology jointly with 5th Ukrainian Congress for Cell Biology: abstracts, Odesa, Ukraine, 2–6 October, 2016. Odesa, Ukraine. P. 19.

10. Gayda G., **Stasyuk N.**, Fayura L., Gonchar M., Sibirny A. Application of arginine-hydrolyzing enzymes in bioanalytics. XV З'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського: тези доповідей, Одеса, Україна, 11-15 вересня 2017, Одеса, Україна, P. 239.

11. Gayda G., **Stasyuk N.**, Klepach H., Zakalskiy A., Zakalska O., Semashko T., Gonchar M. Peroxidase-like nanozymes as efficient platforms for oxidase-based amperometric biosensors. 7th International Weigl Conference: abstracts, Lviv, Ukraine, 26-29 September 2017. Lviv, Ukraine. P. 100.

12. **Stasyuk N.**, Zakalskyi A., Zakalska O., Gonchar M. (His)₆-tagged *Corynebacterium glutamicum* creatinine deiminase as a biosensing element for

creatinine assay. 7th International Weigl Conference: abstracts, Lviv, Ukraine, 26-29 September 2017. Lviv, Ukraine. P. 34.

13. Гончар М.В., **Стасюк Н.Є.**, Закальський А.Є., Закальська О.М. Рекомбінантна (His)₆-тагована креатиніндеіміназа *Corynebacterium glutamicum* як біосенсорний елемент для аналізу креатиніну. XV З'їзд товариства мікробіологів України ім. С.М. Виноградського: тези доповідей, Одеса, Україна, 11-15 вересня 2017. Одеса, Україна. С.256.

14. Gayda G., Smutok O., Klepach H., **Stasyuk N.**, Gonchar M. Microbial enzymes as the effective analytical tools for wine analysis. III International Scientific Conference "Microbiology and Immunology – the Development Outlook in the 21st century: abstracts, Kyiv, Ukraine, 19-20 April, 2018. Kyiv, Ukraine. P.42.

15. Gayda G., Demkiv O., Klepach H., **Stasyuk N.**, Ivash M., Zakalska O., Gonchar M. The development of cost-effective technology for purification of some enzymes from the yeast *Ogataea polymorpha* and their bioanalytical application. International Conference "Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application": abstracts, Rzeszow, Poland, 15-18 May, 2018. Rzeszow, Poland. P. 92.

16. Gayda G., **Stasyuk N.**, Demkiv O., Klepach H., Koretskiy S., Ivash M., Lootsik M., Stolyarchuk I., Gonchar M. Synthesis and characterization of nanomaterials promising for medicine and bioanalytics. International Conference "Advances in Microbiology and Biotechnology": abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.71.

17. Gayda G., **Stasyuk N.**, Fayura L., Zakalskiy A., Zakalska O., Vovk O., Stasyk O., Gonchar M., Sibirny A. Enzymatic methods based on recombinant forms of arginase and arginine deiminase for arginine analysis. International Conference "Advances in Microbiology and Biotechnology": abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.97.

18. Gayda G., Demkiv O., **Stasyuk N.**, Klepach H., Lootsik M., Ivash M., Gonchar M. Amperometric biosensors based on glycerol oxidase and nanoparticles of noble metals as artificial peroxidase. International Conference "Advances in Microbiology and Biotechnology": abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.114.

19. Gonchar M., **Stasyuk N.**, Gayda G., Zakalskiy A., Zakalska O. Alcohol oxidase from the yeast *Ogataea polymorpha* coupled with an artificial peroxidase, Pt/Ru nanoparticles, as a biosensing element. International Conference "Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application": abstracts, Rzeszow, Poland, 15-18 May, 2018. Rzeszow, Poland. P. 151.

20. Gonchar M., Zakalskiy A., Smutok O., **Stasyuk N.**, Demkiv O., Prokopiv T., Zakalska O. Engineered microorganisms for analytical purposes. International Conference "Advances in Microbiology and Biotechnology": abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.55.

21. Smutok O., Karkovska M., **Stasyuk N.**, Gonchar M. Isolation, purification, stabilization and characterisation of flavocytochrome *b*₂ from overproducing cells of *Ogataea polymorpha* "tr1" (*gcr1 catx cyb2*). International Conference "Advances in Microbiology and Biotechnology": abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.122.

22. **Stasyuk N.**, Gayda G., Myronovskij S., Lukavetskyi O., Kit Y., Gonchar M. Simultaneous enzymatic assay of L-arginine and L-citrulline in serum of patients with dysfunction of thyroid gland. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.123.

23. **Stasyuk N.**, Kukhazh Y., Hoivanovych N., Smutok O., Demkiv O., Kavetskyi T., Gonchar M. Improvement of amperometric laccase biosensor using gold nanoparticles coupling with ureasil polymer as a host matrix. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: Lviv, Ukraine, 29-31 October, 2018. Lviv, Ukraine. P.113.

24. Zakalskiy A., **Stasyuk N.**, Zakalska O., Gonchar M. Recombinant (His)₆-tagged creatininedeiminase of *Corynebacterium glutamicum*: purification and enzymological characterization. International Conference “Advances in Microbiology and Biotechnology”: abstracts, Lviv, Ukraine, 29-31 October 2018. Lviv, Ukraine. P.100.

25. Демків О., **Стасюк Н.**, Клепач Г., Гайда Г., Гончар М. Скринінг різних синтетичних нанокмпозитних матеріалів із потенційною пероксидазною активністю. Збірник матеріалів IV Міжнародної науково-практичної конференції, присвяченої 80-річчю Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка «Стан природних ресурсів: перспективи їх збереження та відновлення у контексті сталого розвитку»: тези доповідей, м. Дрогобич, 27-28 жовтня 2020 р. Дрогобич, Україна. С. 129-133.

26. **Стасюк Н.**, Фаюра Л., Демків О., Клепач Г., Гайда Г. Флуорометричний ензиматично-хімічний метод одночасного визначення вмісту L-аргініну та L-цитруліну в крові. IV Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 80-річчю Дрогобицького державного педагогічного університету імені Івана Франка «Стан природних ресурсів: перспективи їх збереження та відновлення у контексті сталого розвитку»: тези доповідей, 27-28 жовтня 2020 р. Дрогобич, Україна. С. 140-143.

АНОТАЦІЯ

Стасюк Н.Є. Мікробні ензими у поєднанні з нанозимами для створення біо(хемо)сенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах наукової доповіді за сукупністю статей.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.07 «Мікробіологія» –Інститут біології клітини Національної академії наук України, Львів, 2023.

Представлена робота присвячена комплексному дослідженню структурних, фізико-хімічних та каталітичних властивостей нанозимів у поєднанні їх з мікробними ензимами, а також вивченню біологічної та токсичної дії (*in vivo*) нанозимних композитів на клітини дріжджів *Ogataea (Hansenula) polymorpha*. Основну увагу в роботі зосереджено на кон'югації наноматеріалів з мікробними ензимами та створенню на їх основі нових біо(хемо)сенсорів та тест-наборів для визначення вмісту практично важливих аналітів, зокрема, креатиніну, L-аргініну, L-лактату, глюкози, етанолу та метиламіну.

Постійно зростаюча необхідність ранньої діагностики багатьох захворювань, поліпшення охорони навколишнього середовища, контролю біотехнологічних процесів, якості харчових продуктів і питної води потребують дедалі ширшого використання у практиці високочутливих, селективних, швидких та економічних методів аналізу. Серед різних аналітичних підходів особлива роль відводиться аналітичній біотехнології – науці, яка використовує принципи біомолекулярного розпізнавання для детекції практично важливих аналітів. Біосенсиори є найновішим досягненням аналітичної біотехнології, вони складаються з двох функціональних частин: біоселективного елемента — іммобілізованого біологічно активного матеріалу та фізичного перетворювача, який відповідає за трансляцію біохімічного сигналу в електричний. Головними перевагами біосенсорних підходів є висока чутливість, селективність та відтворюваність сигналу, здовільні діапазони та низькі границі визначення метаболітів, швидкість аналізу, простота у використанні, портативність, економічність, придатність до масового виробництва.

На сьогодні, у розпізнавальних елементах біосенсорів найчастіше використовують ензими завдяки їхній унікальній каталітичній дії. Проте природні ензими, як правило, мають обмежену хімічну та біологічну стабільність, високу вартість, що пов'язано зі складними технологіями їх виділення та очищення з біологічних джерел. Розглядаючи ензими в ролі біоспецифічних перетворювачів, що перетворюють аналіт у форму, яка детектується різними фізичними або хімічними методами, в останні роки особливий інтерес викликає використання нанорозмірних матеріалів, особливо у поєднанні з ензимами, у тому числі, для розробки технологій одержання біонаноматеріалів із каталітичними властивостями. Розробка нових нанокаталізаторів – наноимів з високою каталітичною активністю розширює їх застосування в біоаналітиці.

Наноими – це найновіший клас функціональних наноматеріалів, які мають ензимоподібну активність. Порівняно з природними ензимами, наноими володіють підвищеною стабільністю та більшою доступністю завдяки відносно простим технологіям синтезу. Важлива перевага наноимів – залежність їхньої активності від розміру/складу наночастинок (НЧ). Це дозволяє створювати нові матеріали з широким діапазоном каталітичної активності, просто змінюючи форму, структуру та склад НЧ. Наноими (НЗ) також мають унікальні властивості, порівнюючи з іншими штучними ензимами, зокрема велику питому площу поверхні, що значно полегшує їхню подальшу модифікацію та біокон'югацію. Здатність наноматеріалів до спонтанної структурної самоорганізації також є дуже важливою характеристикою для біології та медицини завдяки легшому включенню біологічних компонентів у структуру наноматеріалу. Завдяки своїй каталітичній активності НЗ можуть застосовуватися в наукових дослідженнях, біотехнології та харчовій промисловості, сільському господарстві, для деградації забруднювачів навколишнього середовища (очищення стічних вод, деградація хімічних бойових речовин), а також у клінічній діагностиці та фармакології. Крім їхнього використання як діагностичних засобів, наноими є перспективними каталітичними компонентами терапевтичних препаратів. Завдяки біосумісності та магнітним властивостям деяких наноимів, їх можна використовувати для локального цілеспрямованого лікування злоякісних утворень. Наноими можуть слугувати антиоксидантами при лікуванні аутоімунних

захворювань, хвороб Альцгеймера та Паркінсона, а також застосовуватись як антибактерійні засоби. Із відкриттям НЗ як штучних ензимів стало можливим використання явища прямого електронного перенесення при створенні нанозимних біосенсорів «третього покоління», а також для забезпечення вимог щодо їхньої високої каталітичної активності, хімічної та біологічної стабільності, розміру.

Таким чином, прості методики синтезу нанозимів, їхні унікальні каталітичні властивості, а також здатність до специфічного зв'язування ензимів робить їх привабливими кандидатами для досліджень у біосенсорних технологіях. Саме тому, створення нових біонанокомпозитів (імобілізованих мікробних ензимів на поверхні наноматеріалів) із подальшим використанням їх у біосенсориці, а також в ензиматичному аналізі є актуальним завданням.

Метою роботи було дослідження структурних, фізико-хімічних і каталітичних властивостей штучних ензимів – нанозимів у поєднанні з мікробними ензимами для створення на їхній основі нових діагностичних методів, придатних для використання у клінічній діагностиці, фармацевтиці та харчових технологіях, а також вивчення біологічної дії нанозимних композитів на еукаріотичні клітини (зокрема, на моделі дріжджів).

У роботі використано комплекс різноманітних методів, зокрема, мікробіологічні, генно-інженерні, біохімічні, фізико-хімічні, електрохімічні, аналітичні та біосенсорні методи дослідження. При аналізі активності ензимів та чистоти ензимних препаратів використано методи спектрофотометричного аналізу, електрофорезу білків за нативних та денатуруючих умов, іонообмінна та афінна хроматографія. Для фізико-хімічного та структурного аналізу наноматеріалів використано методи сканувальної електронної мікроскопії, рентгеноспектрального аналізу, атомно-силової мікроскопії, трансмісійної електронної мікроскопії, Раман-спектроскопії та спектроскопії ядерного магнітного резонансу. Як референтні методи для аналізу іонів металів (Mn^{2+} та Co^{2+}) використано атомно-абсорбційну спектроскопію. При конструюванні амперометричних біосенсорів застосовано циклічну вольтамперометрію та хроноамперометрію, статистичний і кореляційний аналіз.

Отримано експериментальні дані, які вперше в науковій практиці доводять можливість заміни природного ензиму – каталази штучними «катазимами», які повністю відновлюють здатність мутантних безкаталазних клітин метилотрофних дріжджів рости на метанолі. Молекулярно-генетичний аналіз та секвенування локусу геному штаму дріжджів *Ogataea polymorpha* C-105 виявив дві мутації у гені каталази: заміна азотистої основи цитозину (C) у 895 положенні кодуєчої послідовності на азотисту основу тимін (T) та делеція C у положенні 896. Така комбінація веде до зсуву рамки зчитування і утворення стоп-кодону TGA, що спричинює у клітинах штаму C-105 продукцію нефункціонального, неповного протеїну. Уперше показано різну цитотоксичну дію синтезованих нанозимів на клітини дріжджів *O. polymorpha*. На моделі високоочищеної Манган-залежної рекомбінантної людської аргінази I вперше отримано препарати апоензиму, позбавленого металу, та здійснено реконструкцію холоензиму. Уперше розроблено новий ензиматичний метод на основі апоензиму аргінази I та 2,3-бутандіонмонооксиму для селективного та ультрочутливого визначення вмісту

йонів Mn^{2+} та Co^{2+} (на рівні 1 пМ для йонів Mn^{2+} та 2,5 пМ для йонів Co^{2+}). Уперше опрацьовано чутливі та селективні ензиматичні методи кількісного аналізу L-аргініну із флуоресцентним та спектрофотометричним способом детектування кольорового продукту реакції за допомогою о-фталевого альдегіду та високоочищених препаратів аргінази I і уреази або аргініндеїмінази. Уперше використано поєднання каталітичних наноматеріалів та високоочищених препаратів ензимів класу гідролаз: аргінази I, креатиніндеїмінази, аргініндеїмінази при формуванні біоселективних елементів амперометричних біосенсорів на L-аргінін та креатинін. Уперше за використання наноміметиків пероксидази і природної алкогольоксидази створено нові ензимо-нанозимні методи аналізу етанолу.

Ключові слова: мікробні клітини, ензими, аргініноксидаза, метиламінооксидаза, алкогольоксидаза, глюкозооксидаза, пероксидаза, креатиніндеїміназа, аргіназа, аргініндеїміназа, L-лактат:цитохром c-оксидоредуктаза (флавоцитохром b_2), нанозими.

SUMMARY

Stasyuk N.Ye. “Microbial enzymes combined with nanozymes for creation of bio(chemo)sensors and test kits for determining the content of practically important analytes” – Qualifying scientific work in the form of a scientific report based on research articles.

Thesis for Doctor of Sciences degree in Biology (specialty 03.00.07 – Microbiology). Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine, Lviv, 2023.

The presented work is devoted to a comprehensive study of the structural, physicochemical, and catalytic properties of nanozymes in combination with microbial enzymes, as well as to the study of the biological and toxic effects (*in vivo*) of nanozyme composites on *Ogataea (Hansenula) polymorpha* yeast cells. The main focus of the work is directed on the conjugation of nanomaterials with microbial enzymes and on their basis the creation of new bio(chemo)sensors and test kits for determining the content of practically important analytes, in particular, creatinine, L-arginine, glucose L-lactate, ethanol and methylamine.

The ever-increasing need for early diagnosis of many diseases, improvement of environmental protection, control of biotechnological processes, quality of food products and drinking water require the wider use in practice of highly sensitive, selective, fast and economical methods of analysis. Among various analytical approaches, a special role is assigned to analytical biotechnology – a science that uses the principles of biomolecular recognition for the detection of practically important analytes. Biosensors are the newest achievement of analytical biotechnology, they consist of two functional parts: a bioselective element — an immobilized biologically active material and a physical transducer responsible for translating a biochemical signal into an electrical one. The main advantages of biosensor approaches are high sensitivity, selectivity and reproducibility of the signal, satisfactory ranges and low limits of determination of metabolites, speed of analysis, ease of use, portability, economy, suitability for mass production.

Nowadays, enzymes are most often used in the recognition elements of biosensors due to their unique catalytic action. However, natural enzymes, as a rule, have limited chemical and biological stability, high cost, which is associated with complex technologies for their isolation and purification from biological sources.

To consider enzymes as biospecific transducers that convert the analyte into a form that can be detected by various physical or chemical methods, the use of nanoscale materials, especially in combination with enzymes, including for the development of technologies for obtaining bionanomaterials with catalytic properties, has attracted special interest in recent years. The development of new nanocatalysts – nanozymes with high catalytic activity expands their use in bioanalysis. Thus, the simple methods of synthesis of nanozymes, their unique catalytic properties, as well as the ability to specifically bind enzymes make them attractive candidates for research in biosensor technologies. Nanozymes are the newest class of functional nanomaterials that have enzyme-like activity. Compared to natural enzymes, nanozymes have increased stability and greater availability due to relatively simple synthesis technologies. An important advantage of nanozymes is the dependence of their activity on the size/composition of nanoparticles (NPs). This makes it possible to create new materials with a wide range of catalytic activity by simply changing the shape, structure and composition of NPs. Nanozymes also have unique properties compared to other artificial enzymes, in particular, a large specific surface area, which greatly facilitates their further modification and bioconjugation. The ability of nanomaterials for spontaneous structural self-organization is also a very important characteristic for biology and medicine due to the easier incorporation of biological components into the nanomaterial structure. Due to their catalytic activity, NPs can be used in scientific research, biotechnology and the food industry, agriculture, for the degradation of environmental pollutants (wastewater treatment, degradation of chemical warfare agents), as well as in clinical diagnostics and pharmacology. In addition to their use as diagnostic tools, nanozymes are promising catalytic components of therapeutic drugs. Due to the biocompatibility and magnetic properties of some nanozymes, they can be used for local targeted treatment of malignant formations. Nanozymes can serve as antioxidants in the treatment of autoimmune diseases, Alzheimer's and Parkinson's diseases, and can also be used as antibacterial agents. With the discovery of NPs as artificial enzymes, it became possible to use the phenomenon of direct electron transfer in the creation of "third generation" nanoscale biosensors, as well as to meet the requirements for their high catalytic activity, chemical and biological stability, and size. So, the creation of new bionanocomposites (immobilized microbial enzymes on the surface of nanomaterials) and their further application in biosensors, as well as in enzymatic analysis, is an urgent task.

The main aim of the work was to study the structural, physicochemical and catalytic properties of artificial enzymes – nanozymes in combination with microbial enzymes to create new diagnostic methods on their basis, suitable for use in clinical diagnostics, pharmaceuticals and food technologies, as well as to study the biological effect of nanozyme composites on eukaryotic cells (on the yeast model).

A complex of various methods was used in the work, in particular, microbiological, genetic engineering, biochemical, physicochemical, electrochemical, analytical and biosensor research methods. The methods of spectrophotometric analysis, protein

electrophoresis under native and denaturing conditions, ion exchange and affinity chromatography were used to analyze the activity of enzymes and the purity of enzyme preparations. The methods of scanning electron microscopy, X-ray spectral analysis, atomic force microscopy, transmission electron microscopy, Raman spectroscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy were used for the physicochemical and structural analysis of nanomaterials. Atomic absorption spectrophotometry was used as a reference method for the analysis of metal ions (Mn^{2+} and Co^{2+}). During the construction of amperometric biosensors, cyclic voltammetry, chronoamperometry, statistical and correlation analysis were used.

Experimental data were obtained which, for the first time in the world, prove the possibility of replacing the natural enzyme catalase with artificial "catazyme", which restores the ability of mutant non-catalase yeast cells to grow on methanol. Molecular-genetic analysis and sequencing of the genome locus of the yeast strain *Ogataea polymorpha* C-105 revealed two mutations in the catalase gene: replacement of nitrogenous base of cytosine (C) at the 895 position of the coding sequence by thymine (T) and deletion of C at the 896 position; this combination leads to a shift in the reading frame and the formation of the stop codon TGA, which causes the production of non-functional, incomplete catalase protein in the strain C-105. For the first time, different cytotoxic effect of synthesized nanozymes on the yeast *O. polymorpha* cells was shown. Highly purified manganese-dependent recombinant human arginase I preparations of the metal-free apoenzyme were obtained for the first time, and the reconstruction of the holo-enzyme was carried out. For the first time, a new enzymatic method based on apoenzyme arginase I and 2,3-butanedione monooxime was developed for the selective and ultrasensitive determination of the content of Mn^{2+} and Co^{2+} ions (on the level 1 pM for the Mn^{2+} ions and 2,5 pM for $-\text{Co}^{2+}$ ions). For the first time, sensitive and selective enzymatic methods for the quantitative detection of L-arginine with fluorescent and spectrophotometric detection of the colored reaction product using *o*-phthalaldehyde and highly purified preparations of arginase I and urease or arginine deiminase were developed. For the first time, a combination of catalytic nanomaterials and highly purified preparations of enzymes of hydrolases, in particular, arginase I, creatinine deaminase, arginine deaminase was used in the formation of bioselective elements of amperometric biosensors selective for L-arginine and creatinine. For the first time, a new enzyme-nanozyme methods for ethanol analysis were created using nanomimetics of peroxidase and natural alcohol oxidase.

Key words: microbial cells, enzymes, arginine oxidase, methylamine oxidase, alcohol oxidase, glucose oxidase, peroxidase, creatinine deiminase, arginase, arginine deiminase, L-lactate: cytochrome c oxidoreductase (flavocytochrome b_2), nanozymes.

Підписано до друку 07.12.2023 р.
Формат 60х84/16. Папір офсетний.
Друк: принтер. Зам. №07/12-1.
Ум. друк. арк. 1,8.
Тираж 100 прим.

Видавництво “ГАЛИЧ-ПРЕС”
Видавець ФОП Мацько Б.В.
м. Львів, вул. Гнатюка, 17
Ел. пошта: lvivprint@ukr.net. Тел. [096-59-88-924](tel:0965988924)
Свідоцтво ДК №7731 від 07.02.2023 р.