

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Ким Александр Леонидович

**Разработка биосенсоров на основе фермент-содержащих
полиэлектролитных микрокапсул**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена на кафедре синтетической биологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова и в ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук»

Научный руководитель: *Тихоненко Сергей Алексеевич*
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: *Букреева Татьяна Владимировна – доктор химических наук, доцент, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова РАН, отдел рентгеновских и синхротронных исследований, заведующая лабораторией биоорганических структур*
Балабушевич Надежда Георгиевна – доктор химических наук, доцент, ФГБУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», химический факультет, кафедра химической энзимологии, старший научный сотрудник
Бонарцев Антон Павлович – доктор биологических наук, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет, кафедра биоинженерии, доцент

Защита диссертации состоится «31» октября 2023 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета МГУ.015.2 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, аудитория М-1.

Тел. 8(495)939-35-46, электронная почта: *nvkostina@mail.ru*

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.2/2633>

Автореферат разослан «27» сентября 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.015.2,
кандидат биологических наук



Н.В. Костина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Для обеспечения контроля качества пищевой продукции, постановки диагноза пациента и мониторинга его состояния необходима информация о составе анализируемой пробы и концентрации входящих в нее аналитов, в частности, таких как мочевина, этанол и глюкоза. В настоящий момент для определения концентраций этих веществ широко используют энзимологические методы анализа (Bisswanger, 2014). Однако такие методы имеют ряд недостатков: неоднозначность анализа в присутствии протеаз, относительно небольшое время хранения фермента в растворе, однократное использование фермента и т.д.

Применение методов иммобилизации ферментов при создании диагностических систем позволяют устранить указанные недостатки (Mohamad et al., 2015). Один из таких методов - включение фермента в гель, который широко распространен благодаря своей относительной простоте в изготовлении и невысоким денежным затратам (Sharma et al., 2010). Однако биосенсоры, полученные подобным способом, обладают небольшим сроком хранения из-за неустойчивости гелевой матрицы (Imam et al., 2021).

Другим распространенным методом является иммобилизация молекул фермента между полиэлектrolитными мультислоями на поверхности твердых тел произвольной формы (Decher et al., 1992; Shchukin et al., 2004). Биосенсоры, разработанные на основе этого способа иммобилизации, обладают более длительным сроком хранения, т.к. полиэлектrolитные мультислои, в отличие от гелевой матрицы, обладают большей устойчивостью (Hoogeveen et al., 1996; de Grooth et al., 2015). Одним из недостатков данной технологии является относительно невысокое содержание молекул иммобилизованного фермента на единицу площади покрытия (Shchukin et al., 2004).

Одним из возможных путей решения этой проблемы является инкапсуляция ферментов в полиэлектrolитные микрокапсулы (ПМК). Такие капсулы получают путем поочередной адсорбции противоположно заряженных полиэлектrolитов на коллоидную частицу с последующим ее удалением (Donath et al., 1998). Данные микрокапсулы имеют диаметр от 0,5 до 10 мкм, обладают полупроницаемой оболочкой, состав и толщину которой можно контролировать (Maуа et al., 2003; Shenoy et al., 2003; Sukhorukov et al., 2005).

Львов и соавторы одни из первых продемонстрировали возможность инкапсулирования ферментов в полиэлектrolитные микрокапсулы (Lvov et al., 2001). Они инкапсулировали уреазу в полиэлектrolитные микрокапсулы состава (ПСС/ПАА)₄ с сохранением активности фермента. В дальнейшем идея инкапсулировать ферменты в полиэлектrolитные микрокапсулы получила свое продолжение в виде создания диагностических систем на их основе: микродиагностикум на основе инкапсулированной уреазы и ЛДГ (Сухоруков и др.,

2006); биосенсор на основе инкапсулированной уреазы, иммобилизованной на поверхности рН-электрода (Терновский и др., 2007); полиэлектролитный уреазный микродиагностикум с седиментационной системой регистрации (Дубровский и др., 2017); биосенсор на основе инкапсулированных ферментов с флуоресцентной системой регистрации (Kazakova et al, 2011; Kazakova et al, 2013); биосенсор на основе ПМК с инкапсулированной уреазой и парамагнитными частицами Fe_3O_4 и рН-чувствительного полевого транзистора (Решетилов и др., 2015).

Использование в диагностических системах инкапсулированных в ПМК ферментов имеет ряд преимуществ. Так, Сухоруковым с соавт. показано, что инкапсулированная уреазы сохраняет свою активность более полугода, в то время как нативный фермент - всего неделю; при этом белок не был подвержен негативному воздействию протеаз, находящихся в растворе (Сухоруков и др., 2007). Кроме того, инкапсулированный фермент может быть использован повторно. В частности, в работе Монтреля М.М. с соавторами была показана диагностическая система на основе ПМК, иммобилизованных на поверхности рН-электрода, который может быть использован повторно (Монтрель и др., 2006).

Несмотря на то, что диагностические системы на основе полиэлектролитных микрокапсул были предложены около 20 лет назад, возможности этих систем до конца не раскрыты. В частности, расширение спектра инкапсулированных ферментов позволит увеличить количество анализируемых субстратов, а использование различных способов регистрации аналитического сигнала позволит получить диагностические системы с новыми уникальными характеристиками. В связи с этим создание диагностических систем на основе инкапсулированных ферментов в полиэлектролитные микрокапсулы представляет перспективное направление исследований.

Цель и задачи работы. Целью настоящей работы является разработка диагностических систем на основе ферментов, инкапсулированных в полиэлектролитные микрокапсулы, для определения концентрации глюкозы, этанола и мочевины.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать многоцветную диагностическую систему для определения концентрации мочевины на основе иммобилизованной на пластине инкапсулированной уреазы со спектрофотометрическим методом регистрации и продемонстрировать возможность ее практического применения.
2. Изучить влияние полиэлектролитов полистиролсульфоната (ПСС) и полиаллиламина (ПАА) на каталитические характеристики АДГ.
3. Разработать многоцветную диагностическую систему для определения концентрации этанола на основе инкапсулированной алкогольдегидрогеназы

со спектрофотометрическим методом регистрации и продемонстрировать возможность ее практического применения.

4. Разработать биосенсор на основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью, и продемонстрировать возможность его практического применения.
5. Увеличить чувствительность разработанного биосенсора на основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью, за счет его модификации мультислойными углеродными нанотрубками. Определить его диагностические характеристики.

Объектами исследования являлись ферменты алкогольдегидрогеназа, глюкозооксидаза и уреазы в свободном и инкапсулированном состоянии, а также диагностические системы, разработанные на их основе.

Предметом исследования являлось определение функциональных характеристик диагностических систем и биосенсоров на основе ферментов алкогольдегидрогеназа, глюкозооксидаза и уреазы, инкапсулированных в полиэлектролитные микрокапсулы.

Научная новизна работы

Разработана диагностическая система на основе инкапсулированной уреазы, иммобилизованной на поверхности кварцевой пластины, со спектрофотометрическим методом регистрации. Полученная диагностическая пластина позволяет многократно определять концентрацию мочевины в диапазоне от 3 до 40 мМ.

Впервые изучено влияние полиэлектролитов полиаллиламина и полистиролсульфоната на алкогольдегидрогеназу. Показано незначительное снижение активности АДГ в присутствии ПСС, которое нивелируется добавлением в реакционную смесь хлорида натрия (0.2 М) или сульфата аммония (0.1 М).

Показано, что полиаллиламин ингибирует активность алкогольдегидрогеназы. Установлено, что с увеличением концентрации хлорида натрия (более 100 мМ) снимается ингибирующее воздействие ПАА на АДГ за счет электростатического экранирования поверхностных зарядов фермента ионами соли. Сульфат аммония в низких концентрациях (5 мМ) снимает ингибирующее воздействие ПАА на АДГ.

В дальнейшем была разработана диагностическая система для определения концентрации этанола на основе инкапсулированной алкогольдегидрогеназы со спектрофотометрическим методом регистрации.

Разработана диагностическая система на основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью. Разработанная система была использована для анализа глюкозы в реальных образцах сока и показана высокая корреляция данных, полученных предложенным и стандартным методом измерения глюкозы.

Увеличена чувствительность разработанного глюкозного биосенсора за счет его модификации мультислойными углеродными нанотрубками, коэффициент чувствительности биосенсора увеличился с 0,05 $\mu\text{A}/\text{mM}$ до 0,94 $\mu\text{A}/\text{mM}$.

Теоретическая и практическая значимость работы. В данной работе исследовано влияние полиэлектролитов полиаллиламина и полистиролсульфоната на активность алкогольдегидрогеназы и глюкозооксидазы. Полученные результаты имеют важное теоретическое значение, так как расширяют знания о влиянии полиэлектролитов на биологические макромолекулы и механизмах ингибирования ферментов. Полученные данные могут быть использованы в биотехнологических и медицинских исследованиях, связанных с влиянием полиэлектролитов на биологические системы.

В результате исследования были разработаны диагностические системы для определения концентрации этанола, мочевины и глюкозы в растворах. Полученные системы обладают высокой чувствительностью и точностью определения, а также позволяют многократно проводить анализы в широком диапазоне концентраций. Применение полиэлектролитных капсул для иммобилизации ферментов значительно увеличивают срок службы биосенсоров, что делает их применение более экономически выгодным. Разработанные системы могут найти применение в медицинской диагностике, контроле качества продуктов питания и других областях, где требуется быстрое и точное определение концентрации соединений в растворах.

Методология и методы исследования. Выбор ферментов для инкапсулирования был обусловлен их востребованностью в качестве биоселективного элемента при разработке диагностических систем. В работе для инкапсулирования ферментов использовался один из двух методов: метод копреципитации (Petrov et al., 2008) и метод адсорбции (Kochetkova et al., 2013a). Для формирования полиэлектролитных микрокапсул в качестве микроматриц использовали микросферолиты карбоната кальция (Antipov et al., 2003). Для формирования оболочки ПМК использовали полиэлектролиты полиаллиламин и полистиролсульфонат. Активность ферментов определяли спектрофотометрическими (Guru and Taranath Shetty, 1990; Van Staden and Taljaard, 1997) и амперометрическими методами (Karyakin et al., 1994). Для закрепления полиэлектролитных микрокапсул с инкапсулированной уреазой на поверхности кварцевой пластины использовали модифицированный метод, описанный в работе (Монтрель и др., 2006). Для закрепления ПМК на рабочем электроде

трехконтактного печатного электрода модифицировали поверхность берлинской лазурью (Karyakin et al., 1994), после чего наносили суспензию ПМК с инкапсулированной глюкозооксидазой.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанная многоцветная диагностическая система на основе иммобилизованной на пластине инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы уреазы со спектрофотометрическим методом регистрации позволяет определить концентрацию мочевины.
2. Полиаллиламин снижает активность алкогольдегидрогеназы, однако 5 мМ сульфата аммония и высокая ионная сила (200 мМ NaCl) снимают данное ингибирующее воздействие.
3. Разработанная диагностическая система многократного использования на основе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы алкогольдегидрогеназы со спектрофотометрическим методом регистрации позволяет определить концентрацию этанола.
4. Разработанный биосенсор на основе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью, позволяет определить концентрацию глюкозы.
5. Повышена чувствительность разработанного биосенсора на основе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью, путем модификации многослойными углеродными нанотрубками.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов определяется значительным объемом проведенных исследований, использованием в работе современных экспериментальных, статистических и биофизических методов. Достоверность результатов также подтверждается публикациями в рецензируемых отечественных и международных журналах и патентом РФ. Результаты диссертации были представлены на следующих российских и международных конференциях: «Ломоносов-2017» и «Ломоносов-2021» (Москва, 2017, 2021), «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» XXIX Зимняя молодежная научная школа (Москва, 2017), «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии XXX зимняя молодежная научная школа» (Москва, 2018), «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино, 2018), «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2022).

Личный вклад автора. Автором самостоятельно спланирован и проведен комплекс теоретических и экспериментальных исследований. Автор, Ким

Александр Леонидович, провел анализ актуальной литературы по теме работы. Проведение экспериментов требовало кооперации с различными научными группами. Исследования по иммобилизации инкапсулированной глюкозооксидазы на поверхности трехконтактного печатного электрода проведены в сотрудничестве с лабораторией биосенсоров Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН. Автор провел обработку всех полученных результатов, а также участвовал в подготовке публикаций к печати.

Структура работы. Работа состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», и «Список литературы». Работа изложена на 109 страницах, содержит 32 рисунка и 6 таблиц. Список литературы включает 175 источников, в том числе 147 иностранных.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 7 научных работ, среди них 5 статей в журналах, индексируемых в базах данных WoS, Scopus и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова, 1 глава в книге и 1 патент РФ. В статьях и патенте, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Благодарности. Автор выражает свою благодарность и признательность за научное руководство своему научному руководителю – к.б.н. Тихоненко Сергею Алексеевичу, сотрудникам научной группы по изучению полиэлектролитных микрокапсул Мусину Егору Валиевичу и Дубровскому Алексею Владимировичу, а также сотрудникам лаборатории роста клеток и тканей ИТЭБ РАН. Отдельную благодарность автор выражает своим родителям – Ким Екатерине Владимировне и Киму Леониду Владимировичу за напутствие и моральную поддержку, которые сопровождали меня все эти годы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы рассмотрены современные представления о биохимических методах анализа, которые используют в промышленности, медицине и пищевых производствах. Особенно подробно описано сравнение диагностических систем на основе свободных и иммобилизованных ферментов. Представлены основные тенденции развития диагностических систем, которые в качестве биосенсора используют молекулы ферментов. Приводится подробная характеристика различных диагностических систем, разработанных на основе полиэлектролитных микрокапсул. Подробно описаны недостатки данных систем и обозначена необходимость в их решении при помощи изучения взаимодействий оболочки микрокапсулы с инкапсулируемым веществом. Особое внимание уделяется рассмотрению механизмов образования полиэлектролит-белкового комплекса.

Глава 2. Результаты и обсуждение

Разработка диагностической системы для определения концентрации мочевины на базе инкапсулированной уреазы иммобилизованной на поверхности пластины

С целью закрепления микрокапсул на кварцевой пластине использовали модифицированную технологию описанную в работе (Монтрель и др., 2006). На первом этапе на кварцевую пластину наносили полимеры - (ПЭИ/ПСС/ПАА/ПСС). Далее суспензию микрокапсул состава (ПСС/ПАА)₂, содержащие уреазу, наносили на полученную полимерную пленку, поверхностный заряд которой противоположен заряду капсул. На последнем этапе микрокапсулы фиксировали дополнительными слоями полиэлектролитов и удаляли CaCO₃ ядра из ПМК при помощи раствора ЭДТА. В результате была получена диагностическая пластина на основе инкапсулированной уреазы, которая сохраняет свою активность.

Одним из основных преимуществ диагностической пластины является ее многократное применение благодаря возможности извлечения сенсорного компонента (инкапсулированной уреазы) из реакционной среды и повторного его использования. Для изучения применения диагностической пластины использовали модифицированный фотометрический метод Бертло (по конечной точке), где уреазу заменяли на диагностическую пластину. Оптические плотности окрашенных продуктов реакции в результате гидролиза мочевины в присутствии нитропруссиды и салицилата были получены с использованием одной диагностической пластины с закрепленными на ней ПМК с уреазой. В результате, при многократном (до 60 раз) использовании диагностической пластины, относительные стандартные отклонения не превышают порогового значения 9,6 %.

Аналогичным образом был определен линейный диапазон определяемых концентраций мочевины. В результате было показано, что полученная диагностическая пластина позволяет обнаружить концентрацию мочевины в диапазоне от 2 до 50 ммоль/л, с линейным диапазоном определяемых концентраций от 3 до 40 ммоль/л; при этом коэффициент вариации в линейном диапазоне не превышает 7%.

Кроме того, одной из отличительных особенностей данной диагностической системы является низкий уровень трудозатрат, необходимых для извлечения диагностической пластины из анализируемого раствора. Так, извлечение пластины из анализируемого раствора, ее промывка дистиллированной водой в три этапа и повторное использование занимают не более одной минуты.

Кроме того, была проведена работа по изучению возможности использования диагностических пластин для анализа биологических жидкостей. Для этого была взята сыворотка крови у 5-ти пациентов и определена концентрация мочевины по стандартному уреазному методу Бертло как с использованием свободного фермента (сертифицированный набор (КТ) Мочевина Диакон-ДС), так и с использованием

диагностической пластины. Эти результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Сравнение результатов применения стандартного уреазного метода Бергло с использованием свободного фермента и диагностической пластины.

Образец	Диагностическая пластина, мМ	Относительное стандартное отклонение, %	Свободный фермент, мМ	Относительное стандартное отклонение, %
1	16,20	3,14	15,90	1,73
2	10,90	4,19	11,30	2,21
3	19,30	2,20	20,10	1,43
4	15,40	1,50	15,90	3,62
5	38,20	3,75	39,90	2,10

Из таблицы 1 видно, что данные измерения с помощью свободного фермента и диагностической пластины отличаются не более чем на 4,26%. Таким образом, полученная диагностическая пластина может быть использована для определения концентрации мочевины в плазме крови.

Влияние полиаллиламина на активность алкогольдегидрогеназы

Необходимым условием для создания диагностических систем для определения концентрации этанола с применением полиэлектролитных микрокапсул является минимальное влияние их оболочки на инкапсулированный фермент. В связи с этим, было изучено влияние полиаллиламина и полистиролсульфоната на каталитические характеристики алкогольдегидрогеназы (АДГ). На первом этапе было изучено влияние ПАА на активность АДГ. Результаты представлены на рисунке 1.

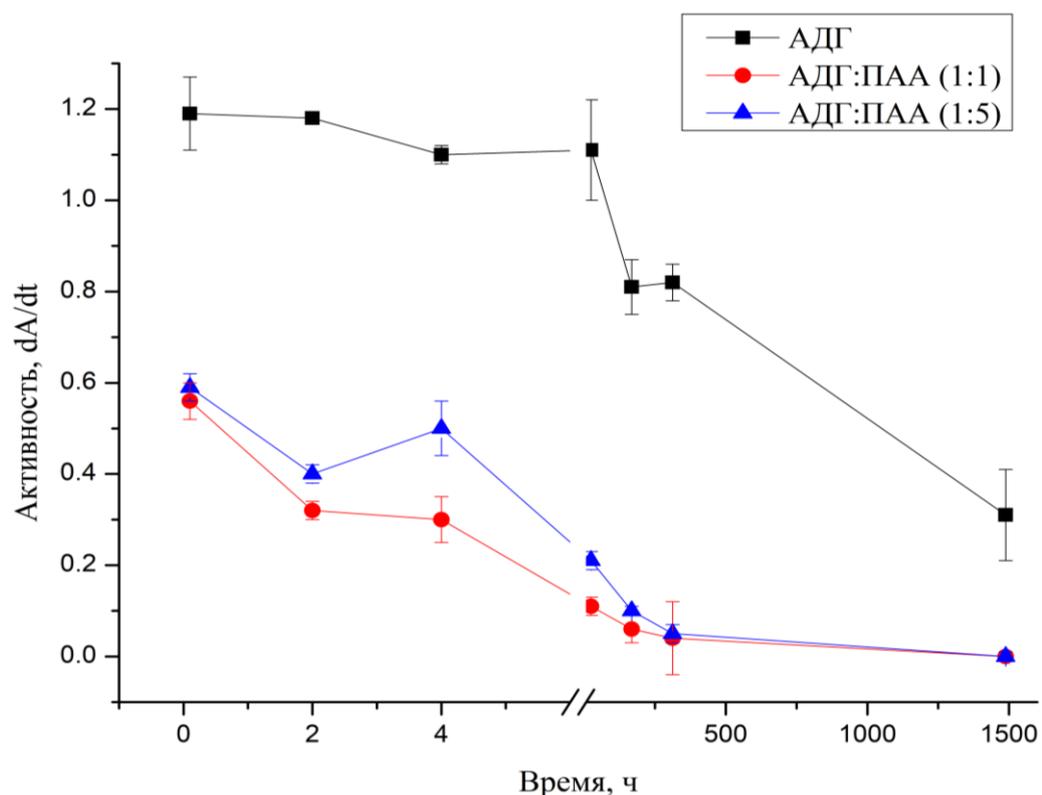


Рис. 1. Зависимость активности АДГ (алкогольдегидрогеназы) (6,25 мкг / мл) в нативном состоянии и в присутствии ПАА (6,25 мкг / мл, 1: 1; 31,25 мкг / мл, 1: 5) от времени инкубации.

Показано, что при соотношении полиэлектролита к ферменту 1к1 и 5к1 ПАА ингибирует активность алкогольдегидрогеназы в первые минуты инкубации более чем на 50%. При дальнейшей инкубации не наблюдается влияния полиэлектролита на активность алкогольдегидрогеназы, падение активности с течением времени объясняется инактивацией фермента. Предположительно данный эффект может быть связан с электростатическим взаимодействием фермента с полиэлектролитом (Kayitmazer et al., 2007).

Для подтверждения гипотезы об электростатической природе образования белок-полиэлектролитного комплекса АДГ инкубировали в растворе соли сульфата аммония или хлорида натрия в присутствии полиаллиламина (Рис.2.).

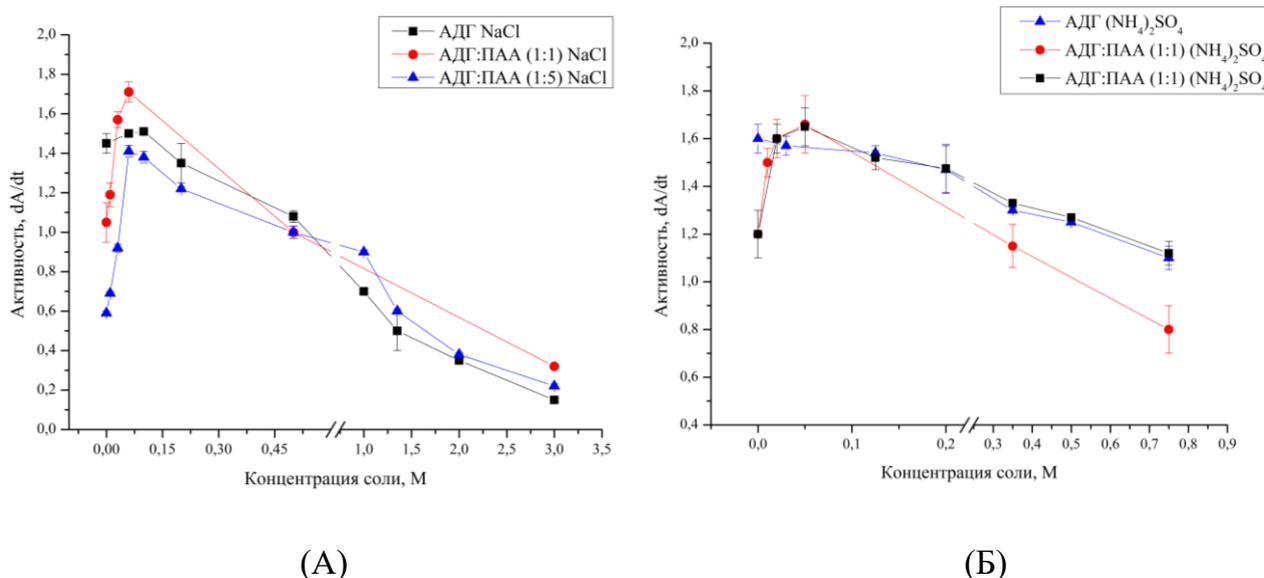


Рис. 2. Зависимость активности АДГ (6,25 мкг/мл) в свободном состоянии и в присутствии ПАА (6,25 мкг/мл, 1:1; 31,25 мкг/мл, 1:5) от концентрации хлорида натрия (А) и сульфата аммония (Б).

Из рисунка 2А видно, что активность фермента увеличивалась с ростом концентрации соли, вплоть до 0,05 М хлорида натрия. Это предположительно связано с уменьшением электростатических взаимодействий между заряженными группами белка и полиэлектролита за счет экранирования их зарядов противоионами соли. Увеличение концентрации NaCl в растворе в дальнейшем приводило к снижению активности фермента вне зависимости от присутствия полиэлектролита, что связано с высаливанием АДГ. Кроме того, было изучено влияние сульфата аммония на АДГ в присутствии ПАА (рис. 2Б.). При добавлении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и последующем добавлении ПАА в раствор АДГ активность фермента увеличивалась с ростом концентрации соли, вплоть до 0,005 М сульфата аммония. Концентрация сульфата аммония в данном случае недостаточна для образования эффекта экранирования между полиэлектролитом и ферментом. Вероятно, предотвращение ингибирования фермента связано с тем, что сульфогруппа соли связывается как с двумя аминоклуппами полиаллиламина, приводя к увеличению жесткости цепи полимера и уменьшению его степеней свободы полиэлектролитной цепи, что уменьшает полиаллиламин-белковое взаимодействие (Сабурова Е.А., Тиноненко С.А., Дыбовская Ю.Н., 2008). В дальнейшем было показано, что 0.15 М сульфат аммония предотвращает ингибирование фермента полиэлектролитом во время длительной инкубации (1440 ч).

Влияние полистиролсульфоната на активность алкогольдегидрогеназы

На первом этапе изучили влияние ПСС на активность АДГ. Результаты представлены на рисунке 3.

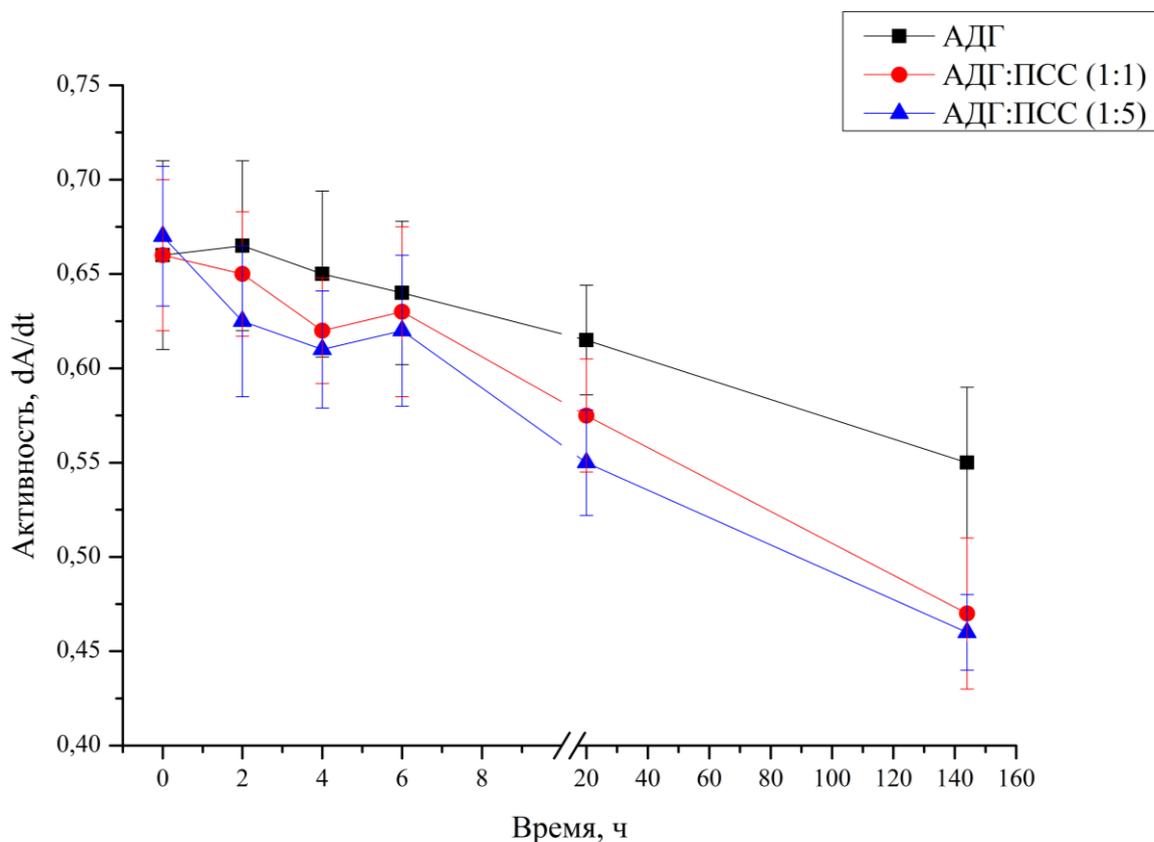


Рис. 3. Зависимость активности АДГ в свободном состоянии и в присутствии ПСС (50 мкг/мл 1/1; 250 мкг/мл, 1/5) от времени инкубации.

Показано, что ПСС не влияет на активность фермента в первые 6 ч инкубации. При дальнейшей инкубации наблюдалось снижение активности фермента в комплексе с ПСС по сравнению с активностью нативной АДГ.

Выше отмечалось, что ПАА снижает активность АДГ за счет электростатической природы взаимодействия. Однако, в присутствии хлорида натрия и сульфата аммония эта активность восстанавливалась до нативной. В связи с этим, было изучено влияние 2.0 М NaCl, 0.2 М NaCl и 0.1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ солей на активность АДГ как в присутствии ПСС, так и без него (рис.4).

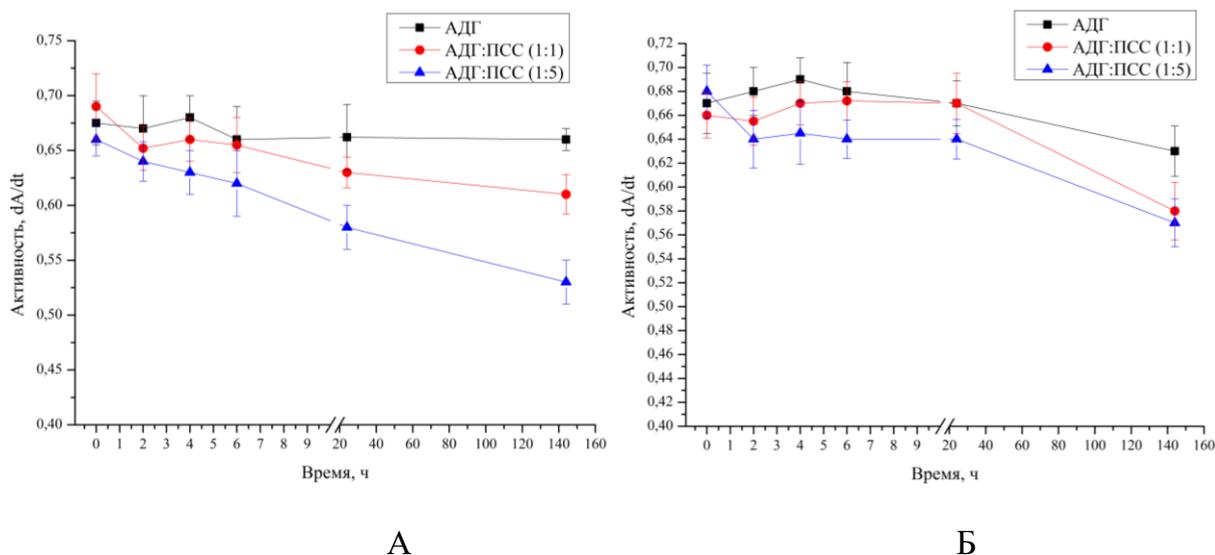


Рис. 4. Зависимость активности АДГ в свободном состоянии и в присутствии ПСС (50 мкг/мл 1/1; 250 мкг/мл, 1/5) и хлорида натрия (А - 0.2 М) или сульфата аммония (Б – 0.1 М) от времени инкубации.

Исследование активности АДГ в растворе 0.2 М хлорида натрия показало (рис. 4а), что присутствие соли снимало инактивацию свободного фермента при длительной инкубации в течение 144 ч. Однако ПСС при этом снижал активность АДГ пропорционально содержанию полиэлектролита. Это предположительно связано с ослаблением электростатических взаимодействий между заряженными группами белка и ПЭ за счет экранирования зарядов противоионами соли, что привело к уменьшению взаимодействия между ними. Добавление 2.0 М хлорида натрия к реакционной смеси приводило к падению активности фермента вне зависимости от присутствия ПСС (Рис.14Б из диссертации). Такое поведение предположительно связано с частичным выпадением белка в осадок. При изучении влияния 0.1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ на активность фермента (рис. 4Б) было установлено, что $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ сохраняет активность АДГ в течение 144 ч и при этом снимает ингибирование фермента полистиролсульфонатом. Снятие ингибирующего воздействия ПСС может быть обусловлено тем, что ионы SO_4^{2-} конкурентно связываются теми же участками молекулы белка, что и сульфогруппы ПСС, снимая тем самым влияние полиэлектролита на активность АДГ. Кроме того, раствор 0.1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ обладает достаточной ионной силой для возникновения экранирующего эффекта между полиэлектролитом и ферментом.

Разработка диагностической системы для определения концентрации этанола на базе инкапсулированной алкогольдегидрогеназы

В дальнейшем в полиэлектролитные микрокапсулы была инкапсулирована алкогольдегидрогеназа для создания диагностической системы на ее основе. Однако, метод копреципитации для инкапсулирования алкогольдегидрогеназы в ПМК не является подходящим (Sukhorukov et al., 2007), т.к. на этапе удаления CaCO_3 ядра

ЭДТА инактивирует фермент. Для инкапсулирования алкогольдегидрогеназы в полиэлектролитные микрокапсулы с сохранением активности фермента использовали метод адсорбции (Kochetkova et al., 2013b), в рамках которого готовые ПМК с уже удаленным CaCO_3 ядром инкубировали в растворе фермента. Данный метод позволяет исключить контакт алкогольдегидрогеназы с ЭДТА, которая образует комплекс с ионами цинка активного центра АДГ и инактивирует ее. Далее были исследованы каталитические характеристики инкапсулированной АДГ. Показано, что константа Михаэлиса K_m по этанолу составляла 71,6 мМ для АДГ в ПМК, в то время как для свободной АДГ эта величина была равна 41,2 мМ; V_{\max} для инкапсулированной АДГ составляла 30 % от величины для свободного фермента. Снижение активности и повышение K_m инкапсулированной алкогольдегидрогеназы может быть результатом иммобилизации фермента в полиэлектролитных микрокапсулах.

На следующем этапе была изучена возможность многократного применения инкапсулированной формы алкогольдегидрогеназы для определения концентрации этанола в растворе. Для этого определяли оптическую плотность раствора на 340 нм после 10 минутной инкубации инкапсулированной АДГ в растворе этанола 200 мМ. Для повторного использования ПМК их извлекали из анализируемой среды методом фильтрации. Полученные результаты представлены на рисунке 5.

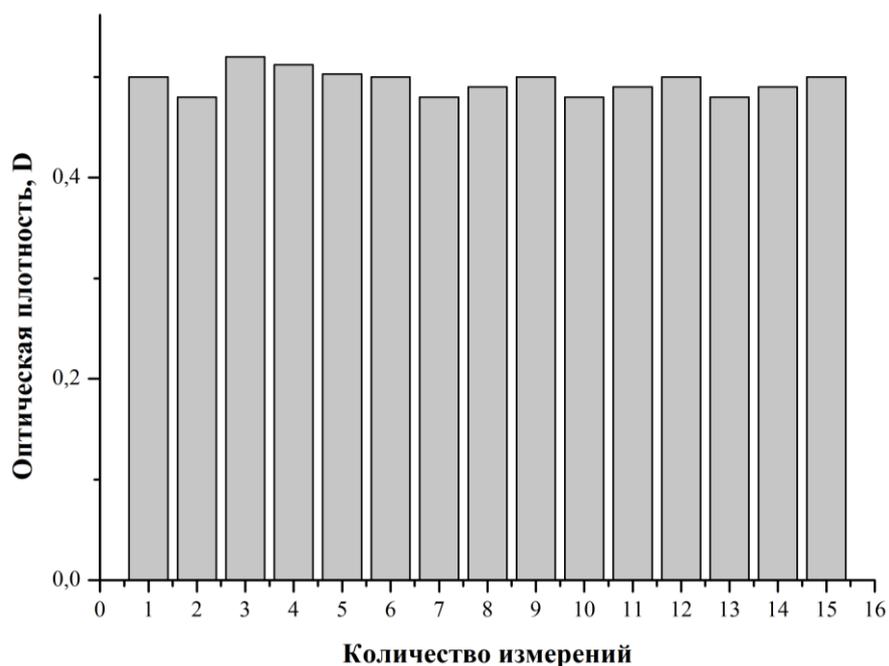


Рис. 5. Многократное применение инкапсулированной алкогольдегидрогеназы.

Из графика видно, что при многократном использовании ПМК с АДГ оптическая плотность раствора изменяется не значительно и относительное стандартное отклонение не превышает 5%. Следовательно, полиэлектролитные микрокапсулы с инкапсулированной алкогольдегидрогеназой могут быть

использованы многократно до 15 раз. В исследовании, проведенном Алпатом и Телефонджу в 2010 году, продемонстрирована диагностическая система на основе алкогольдегидрогеназы иммобилизованной на поверхности стеклоуглеродного электрода при помощи модифицированной целлюлозы (Alpat and Telefoncu, 2010). В этой работе после 15 применений данной системы наблюдалось снижение аналитического сигнала на 20%.

В дальнейшем была изучена возможность применения инкапсулированного АДГ в качестве диагностической системы на этанол, с этой целью был определен диапазон определяемых концентраций этанола при помощи инкапсулированной алкогольдегидрогеназы (рис. 6). Для этого при постоянном перемешивании добавляли инкапсулированную АДГ в раствор НАД⁺(0,2 мМ) и этанола исследуемой концентрации и инкубировали в течение 10 минут. После инкубации спектрофотометрически определяли оптическую плотность раствора в полосе поглощения НАДН при 340 нм.

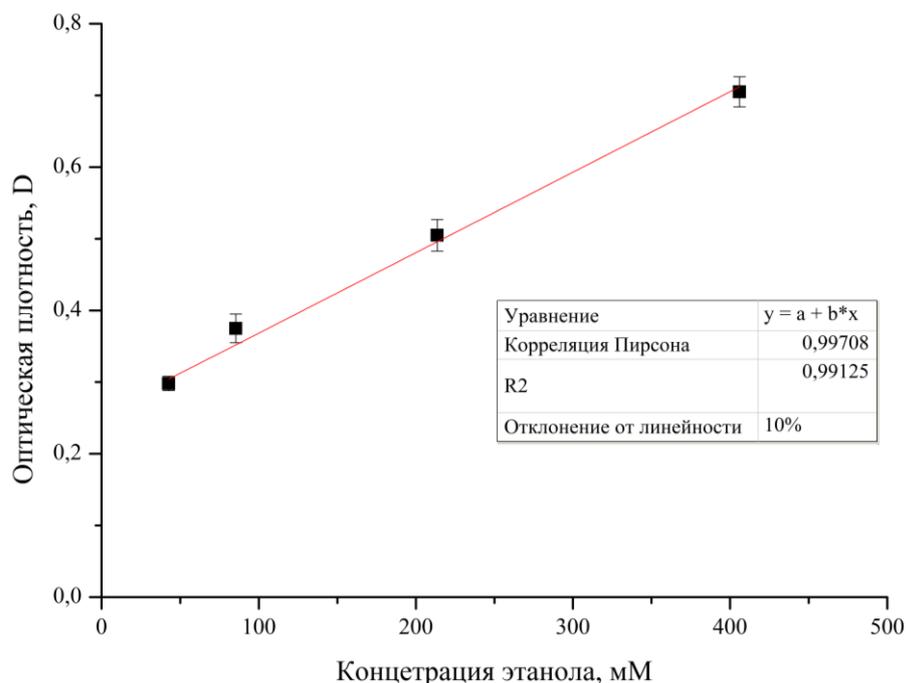


Рис. 6. Изменение оптической плотности от концентрации этанола.

Из рисунка 6 видно, что при использовании инкапсулированной алкогольдегидрогеназы для определения концентрации этанола относительные стандартные отклонения полученных значений оптической плотности не превышают 4,6% в диапазоне концентрация от 40 до 400 мМ. Данный диапазон определяемых концентраций подходит для определения этанола в пищевой промышленности, от 100 до 420 мМ.

Таким образом, инкапсулированная АДГ может быть многократно использована для определения концентрации этанола в растворе с использование спектрофотометрического метода «по конечной точке» в диапазоне концентраций от 40 до 400 мМ, т. к. относительные стандартные отклонения полученных результатов в данном диапазоне не превышает 4,6%.

Разработка диагностической системы для определения концентрации глюкозы на основе глюкозооксидазы инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы

Для создания полиэлектролитных микрокапсул, оболочка которых минимально влияет на инкапсулированный фермент, было изучено влияние полиаллиламина и полистиролсульфоната на каталитические характеристики глюкооксидазы (ГО). Показано, что эти полиэлектролиты не влияют на активность фермента, что позволяет использовать их для инкапсулирования глюкозооксидазы в ПМК.

В дальнейшем, инкапсуляцию глюкозооксидазы проводили методом копреципитации. Полученные ПМК иммобилизовали на поверхности электрода для формирования глюкозного биосенсора. Для этого на рабочий электрод трехконтактного печатного электрода наносили слой берлинской лазури. Затем на поверхность модифицированного берлинской лазурью рабочего электрода наносили суспензию полиэлектролитных микрокапсул с инкапсулированной глюкозооксидазой. Принцип работы полученного электрода показан на рисунке 7.

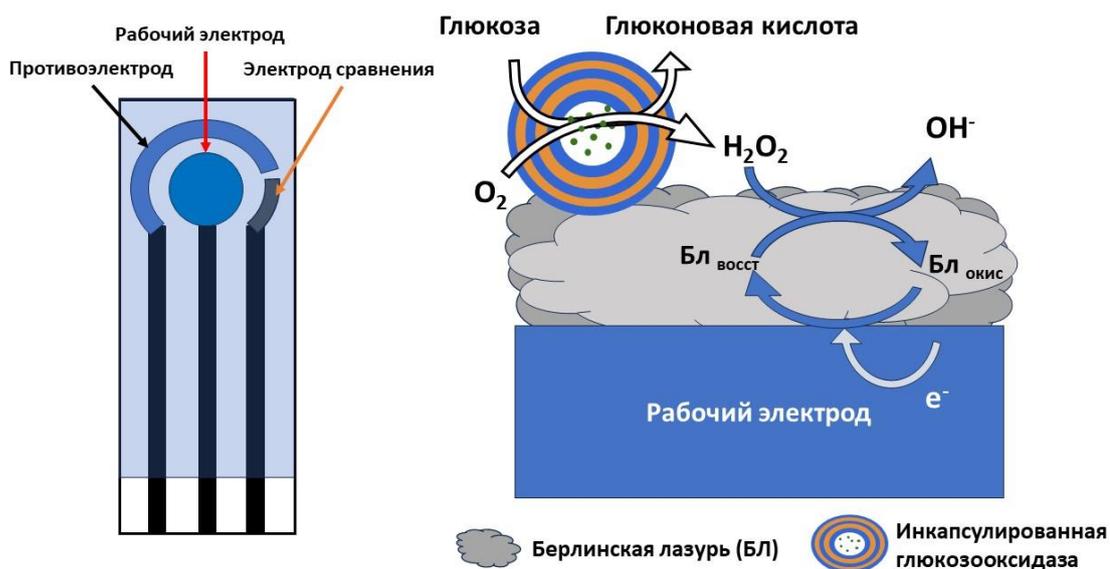


Рис.7. Биосенсор на основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью.

Из рисунка 7 видно, что в результате глюкозооксидазной реакции образуется пероксид водорода, который в дальнейшем выступает в качестве окислителя берлинской лазури. Далее, окисленная форма берлинской лазури восстанавливается за счет прямого переноса электрона с поверхности электрода, что увеличивает ответ выходящего сигнала. Для сравнения характеристик полученного биосенсора использовали трехконтактный печатный электрод с модифицированным берлинской лазурью рабочим электродом и иммобилизованным на его поверхности смеси глюкозооксидазы и хитозана.

Для применения глюкозных биосенсоров в промышленности, медицине или других отраслях необходимо изучить влияние параметров анализируемой среды на активность глюкозооксидазы. Для этого исследовали зависимость полученных сигналов полученного биосенсора от концентрации буферного раствора, его ионной силы и кислотности, а также от концентрации глюкозы в растворе.

Зависимость сигналов биосенсора от состава буферного раствора

Были получены сигналы биосенсора в буферных растворах со значением pH от 5.5 до 8. Максимальные амплитуды ответов биосенсора при иммобилизации фермента в гель хитозана на поверхности электрода наблюдали в области значений pH 6.0-7.0, при иммобилизации капсулированием 5.5-6.0. Полученный сдвиг оптимума в щелочную сторону, скорее всего, связан с иммобилизацией фермента.

Кроме значения pH буфера, также имеет значение его молярность. Показано, что с увеличением молярности использованного буфера сигналы биосенсора с применением хитозана растут и максимальные сигналы соответствуют 40-50 мМ буферному раствору. В то же время для капсулированного фермента наблюдается увеличение сигналов до концентрации 30-40 мМ, при дальнейшем увеличении молярности происходит падение уровня сигнала.

При электрохимических измерениях важно снизить сопротивление буферного раствора, добавление хлорида натрия в буфер приводит к нужному эффекту (A. Chayad et al., 2016). Повышение концентрации NaCl в растворе приводит к увеличению сигнала биосенсора, в то же время при капсулировании фермента увеличение концентрации хлорида натрия выше 25 мМ ведет к уменьшению сигнала. Высокие концентрации хлорида натрия (выше 80 мМ) оказывают негативное влияние на активность фермента, и приводит к уменьшению сигналов биосенсора. Таким образом, увеличение концентрации солей выше 30 мМ оказывает отрицательное влияние на активность фермента в капсуле, при чем ионы калия оказывают более отрицательный эффект (молярность буфера увеличивается за счет ионов как калия, так и натрия, увеличение концентрации ионов натрия выше 30 мМ ведет к падению величины сигналов биосенсора на 10.5 %, в случае совместного увеличения концентрации ионов калия и натрия выше 30 мМ падение сигнала биосенсора составляет 44.4 %). Падение активности может быть связано с изменением структуры капсул при увеличении концентрации солей.

Калибровочные зависимости (градуировочные графики) сигналов биосенсоров от концентрации глюкозы

Как видно из таблицы 2 диапазоны детекции и линейные диапазоны при использовании капсулированного фермента отличаются от таких же характеристик для фермента, иммобилизованного в гель хитозана. Так нижний и верхний пределы детекции выше, а линейный диапазон шире в случае капсулированного фермента. Коэффициент чувствительности же лучше в случае использования для иммобилизации хитозана (1.17 против 0.12 мкА/мМ).

Основные характеристики полученных биосенсоров представлены в таблице 2. Оценку воспроизводимости результатов измерений биосенсором с капсулированным ферментом проводили на основании статистической обработки выборки из 15 измерений концентрации глюкозы, равной 1 мМ. Коэффициент вариации составил 4.5 %, среднее значение сигнала и стандартное отклонение - 151.31 ± 6.88 нА. Для биосенсора с ГО, иммобилизованной в гель хитозана оценка воспроизводимости результатов измерений биосенсором проводилась на основании статистической обработки выборки из 18 измерений концентрации глюкозы, равной 1 мМ. Коэффициент вариации составил 4.6 %, среднее значение сигнала и стандартное отклонение - 587.37 ± 27.08 нА.

Таблица 2. Характеристики полученных глюкозных биосенсоров

Способ иммобилизации фермента Параметр	Иммобилизация в гель хитозана	Капсулирование
Уравнение, описывающее калибровочную зависимость $V = \frac{V_{\max} S^h}{K_M^h + S^h}$, значения параметров	$V_{\max} = 1.398$; $h = 1.176$; $K_m = 1.517$; $R^2 = 0.98$	$V_{\max} = 1.069$; $h = 1.223$; $K_m = 4.071$; $R^2 = 0.99$
Линейный диапазон детекции, мМ	0.02 – 0.60	0.05-5.5
Уравнение регрессии для линейного участка	$y = 1.1749x - 0.0032$	$y = 0,1184x + 0,0456$
Коэффициент корреляции R^2	0.99	0.99
Коэффициент чувствительности, мкА/мМ	1.17	0.12
Минимальный предел обнаружения, мМ	0.02	0.05
Диапазон детекции, мМ	0.02 – 5	0.05 - 10

Оценка долговременной стабильности

Срок службы биосенсоров на базе иммобилизованных ферментов является одним из ключевых параметров данного типа систем, т. к. многократность применения одно из конкурентных преимуществ перед применением нативных свободных ферментов.

Для ГО, встроенной в полиэлектролитные капсулы, через 5 месяцев при хранении между измерениями при 4°C, сигнал биосенсора составлял примерно 74 % от исходного уровня сигнала, в то время как для ГО, иммобилизованной в гель хитозана сигнал биосенсора через 2 месяца составлял 43 % от исходного уровня.

В таблице 3 показано изменение основных параметров биосенсора при хранении. Как видно из таблицы, капсулирование помогает сохранять активность фермента в составе биосенсора на достаточно высоком уровне в течение

длительного времени, что согласуется с данными по инкапсулированной уреазе в работе Сухорукова Б.И. с соавторами (Sukhorukov et al., 2007).

Таблица 3. Изменение основных параметров калибровочной зависимости при хранении биосенсора

Параметр	Иммобилизация в гель хитозана		Иммобилизация в полиэлектролитные капсулы	
	1-й день	ч/з 2 месяца	1-й день	ч/з 5 месяцев
V_{\max}	1.398	0.491	1.069	0.819
h	1.176	1.494	1.223	1.319
K_M	1.517	1.166	4.071	4.276

Метод иммобилизации инкапсулированной ГО на поверхности матричного электрода может найти применение при создании биосенсоров. Капсулирование фермента позволяет увеличить срок службы биосенсора и поддерживать его активность на высоком уровне.

Применение биосенсоров для определения глюкозы в образцах напитков

При определении реальных образцов необходимо учитывать влияние основных веществ, встречающихся в них. Так при определении глюкозы в винных напитках на сигналы биосенсора может оказывать влияние содержание этилового спирта. Были изучены сигналы биосенсора на введение глюкозы в буферах с содержанием этилового спирта в диапазоне 0.1 – 2 М. Сигнал биосенсора при введении глюкозы в концентрации 1 и 5 мМ не изменялся, коэффициент вариации не превышал 5 %. Таким образом, содержание этилового спирта в диапазоне концентраций 0.1 – 2 М не будет влиять на сигнал биосенсора и вносить дополнительную ошибку измерения, и таким биосенсором можно измерять содержание глюкозы в продукции, содержащей алкоголь.

Согласно Федеральному закону от 27 октября 2008 г. №178-ФЗ «Технический регламент на соковую продукцию из фруктов и овощей» ((Технический регламент на соковую продукцию из фруктов и овощей, 2011) на 23.07.2018) содержание кислоты в соках не должно превышать 3 г/л, в нектарах – 5 г/л. В связи с чем было изучено влияние лимонной кислоты в измерительной кювете в диапазоне концентраций 0.06 – 0.9 мМ на сигналы биосенсора при введении глюкозы в концентрации 5 мМ. Присутствие лимонной кислоты не изменяло сигнал биосенсора и значит, присутствие ее в образцах до концентрации 31 мМ (6 г/л) не будет влиять на определение глюкозы.

Полученные биосенсоры были протестированы на реальных образцах сока и алкогольных напитков. Результаты сравнивали с данными стандартного метода определения глюкозы в образцах с помощью спектрофотометрии. Коэффициент

корреляции данных между измерениями, сделанными биосенсором с ГО, иммобилизованной в полиэлектролитные капсулы, и измерениями стандартным методом составляет 0.92. Таким образом, инкапсулированная ГО в ПМК с последующей иммобилизацией на поверхности матричного электрода, модифицированного берлинской лазурью, может применяться для создания биосенсоров.

Модификация углеродными многослойными нанотрубками глюкозного биосенсора на базе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы глюкозооксидазы

При формировании биосенсоров важным параметром, который необходимо учитывать, является проводимость материала измерительного электрода, т.к. он влияет на чувствительность сенсора. Известно, что модификация измерительного электрода углеродными наноматериалами приводит к снижению его сопротивления, а также к увеличению активной поверхности рабочего электрода (Cosnier et al., 2014). Таким образом, для увеличения чувствительности биосенсорной системы на базе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы глюкозооксидазы было предложено модифицировать ее углеродными мультислойными нанотрубками (УМНТ). Для этого на стадии формирования ПМК в оболочку и/или ядро микрокапсулы добавляли суспензию углеродных мультислойных нанотрубок.

В работе были определены активные сопротивления электродов, модифицированных различными компонентами изначального биосенсора. Наибольшие значения сопротивлений были получены для электродов, напечатанных методом трафаретной печати без нанесения каких-либо покрытий. Наименьшее значение сопротивления наблюдалось для композиции, включающей ПМК/ГО с УМНТ в полости и между слоями полиэлектролита. При этом обнаружено снижение сопротивления со 120 до 25 кОм по сравнению с композицией с ПМК/ГО без УМНТ. Таким образом, можно сделать вывод, что включение УМНТ в состав ПМК способствует лучшему переносу электронов в системе, что, в свою очередь, положительно влияет на характеристики биосенсоров на основе ПМК/ГО/УМНТ.

На следующем этапе были исследованы характеристики биосенсоров на основе электродов с берлинской лазурью модифицированных ферментсодержащими ПМК, с использованием капсул с УМНТ и без них в составе ПМК. Для сравнения использовали ГО, иммобилизованную методом простой сорбции на поверхности электрода. В таблице 4 приведены численные значения основных характеристик. Введение УМНТ в капсулы приводит к более высокой чувствительности биосенсора к глюкозе (0,30 мкА/мМ против 0,05 мкА/мМ) при той же концентрации фермента на электроде. Дополнительная модификация поверхности электрода нанотрубками приводит к дальнейшему увеличению сигналов биосенсора. Кроме того, модификация электрода УМНТ изменяет диапазон обнаружения глюкозы (табл. 4). Нижний диапазон обнаружения смещен в сторону более низких концентраций (0,05 мМ), что позволяет определять более низкие концентрации глюкозы.

Таблица 4. Характеристики полученных глюкозных биосенсоров

Параметры	Состав биокатализатора			
	ПМК/ГО/УМНТ + УМНТ на электроде	ПМК/ГО/УМНТ	ПМК/ГО	ГО
Уравнение, описывающее градуировочную зависимость	$V = \frac{V_{\max} S^h}{K_M^h + S^h}$			
Значения параметров градуировочной зависимости	V _{max} =2.56	V _{max} =1.938	V _{max} =1.639	V _{max} =0.959
	H=1.667	H=1.05	H=1.238	H=0.865
	K _m =1.203	K _m =3.194	K _m =16.393	K _m =86.692
	R ² =0.99	R ² =0.99	R ² =0.99	R ² =0.99
Линейный диапазон определяемых концентраций, мМ	0.05-2	0.2-2.7	1-15	0.5-7
Уравнение регрессии линейного участка, коэффициент корреляции R ²	Y=0.9443x+0.0193	Y=0.2966x-0.1161	Y=0.0524x+0.0293	Y=0.0149x+0.0029
	R ² =0.99	R ² =0.99	R ² =0.99	R ² =0.99
Коэффициент чувствительности, мкА/мМ	0.94	0.3	0.05	0.01
Минимально определяемая концентрация, мМ	0.05	0.05	1	0.5
Определяемый диапазон, мМ	0.05-3	0.05-6	1-25	0.5-25

Таким образом, модификация глюкозного биосенсора на основе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы глюкозооксидазы привела к увеличению чувствительности биосенсора и снижению минимально определяемой концентрации глюкозы в растворе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе инкапсулированной уреазы, иммобилизованной на поверхности кварцевой пластины, разработана новая система диагностики мочевины со спектрофотометрическим методом регистрации. Такая диагностическая пластина позволяет многократно (более 60 раз) измерять концентрацию мочевины в диапазоне от 3 до 40 мМ с относительным стандартным отклонением не более 7%.

Впервые исследовано влияние полистиролсульфоната и полиаллиламина на активность свободной алкогольдегидрогеназы. Установлено, что полиаллиламин ингибирует активность АДГ. Показано, что снижение ингибирующего воздействия полиаллиламина на алкогольдегидрогеназу происходит при добавлении сульфат-анионов, которые связываются с аминогруппами полиаллиламина. Установлено, что с увеличением концентрации хлорида натрия снимается ингибирующее воздействие ПАА на АДГ за счет электростатического экранирования поверхностных зарядов фермента ионами соли. Установлено, что инкубация АДГ с ПСС приводит к незначительному снижению ферментативной активности с течением времени. Добавление хлорида натрия (0,2 М) или сульфата аммония (0,1 М) снимает негативное влияние ПСС на активность фермента.

В результате проведённых исследований разработана диагностическая система со спектрофотометрическим методом регистрации, которая позволяет многократно определять концентрацию этанола в диапазоне от 40 до 400 мМ мг/мл с относительным стандартным отклонением менее 4,6%. При этом удалось добиться сохранения активности инкапсулированной алкогольдегидрогеназы на уровне 30% по сравнению с нативным ферментом. Константа Михаэлиса K_m инкапсулированной АДГ по этанолу составляла 71,6 мМ, что в 1,7 раз выше по сравнению со свободным ферментом.

На основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на матричном электроде, разработана диагностическая система с амперометрическим методом регистрации, позволяющая многократно определять глюкозу в диапазоне концентраций от 0,05 до 5,5 мМ с относительным стандартным отклонением не более 5.5%. Система также может быть использована для определения глюкозы в реальных образцах сока и имеет высокую корреляцию с данными, полученными стандартным методом измерения глюкозы.

Увеличена чувствительность разработанного глюкозного биосенсора за счет его модификации мультислойными углеродными нанотрубками, коэффициент чувствительности биосенсора увеличился с 0,05 $\mu\text{A}/\text{мМ}$ до 0,94 $\mu\text{A}/\text{мМ}$.

Результаты исследования могут быть использованы для создания более эффективных диагностических систем и биосенсоров.

ВЫВОДЫ

1. Разработана многоцветная диагностическая система для определения концентрации мочевины на основе иммобилизованной на пластине инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы уреазы со спектрофотометрическим методом регистрации.
2. Показано, что полиаллиламин ингибирует активность алкогольдегидрогеназы, однако сульфат аммония (5 мМ) и высокая ионная сила (200 мМ NaCl) снимают данное ингибирующее воздействие.
3. Разработана диагностическая система многократного использования для определения концентрации этанола на основе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы алкогольдегидрогеназы со спектрофотометрическим методом регистрации.
4. Разработан биосенсор на основе инкапсулированной в полиэлектролитные микрокапсулы глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью.
5. Предложен способ повышения чувствительности разработанного биосенсора на основе инкапсулированной глюкозооксидазы, иммобилизованной на поверхности амперометрического матричного электрода, покрытого берлинской лазурью, путем модификации многослойными углеродными нанотрубками.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Scopus, WoS и RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В.Ломоносова:

1. **Kim A.L.**, Musin E.V, Dubrovskii A.V, Tikhonenko S.A. Effect of Polyallylamine on Alcoholdehydrogenase Structure and Activity // *Polymers*. —2020. — Vol.12. — № 4. — P. 832. (WOS IF 4,967; SJR IF 0,72; Q1) (0,625/0,5) (Здесь и далее в скобках приведен объем публикации в печатных листах и вклад автора в печатных листах)
2. **Kim A.L.**, Musin E.V., Dubrovskii A.V., Tikhonenko S.A. Determination of urea concentration using urease-containing polyelectrolyte microcapsules // *Analytical Methods*. — 2019. — Vol.11. — № 12. — P. 1585-1590. (WOS IF 2,896; SJR IF 0,54; Q2) (0,75/0,6)
3. Plekhanova Y.V., Tikhonenko S.A., Dubrovsky A.V., **Kim A.L.**, Musin E.V., Wang G.-J., Kuznetsova I.E., Kolesov V. V., Reshetilov A.N. Comparative Study of Electrochemical Sensors Based on Enzyme Immobilized into Polyelectrolyte Microcapsules and into Chitosan Gel // *Analytical Sciences*. — 2019. — Vol.35. — № 9. — P. 1037–1043. (WOS IF 2,081; SJR IF 0,27; Q3) (0,3125/0,09375)
4. Reshetilov A., Plekhanova Y., Tarasov S., Tikhonenko S., Dubrovsky A., **Kim A.**, Kashin V., Machulin A., Wang G.J., Kolesov V., Kuznetsova I. Bioelectrochemical properties of enzyme-containing multilayer polyelectrolyte microcapsules modified with multiwalled carbon nanotubes // *Membranes*. — 2019. — Vol.9. — № 4. — P. 1–12. (WOS IF 4,106; SJR IF 0,49; Q2) (0,625/0,1875)
5. Дубровский А.В., Мусин Е.В., **Ким А.Л.**, Тихоненко С.А. Влияние полиэлектролитов на каталитическую активность алкогольдегидрогеназы // *Прикладная биохимия и микробиология*. — 2016. — Т.52. — № 2. — С. 250–254. Doi:10.7868/S0555109916020045. (IF РИНЦ-1,439 (0,25/0,15)) [Dubrovsky A.V., Musin E.V., Kim A.L., Tikhonenko S.A. Effect of polyelectrolytes on catalytic activity of alcohol dehydrogenase // *Applied biochemistry and microbiology*. — 2016. — Vol. 52. — № 2. — P. 233-236. DOI: 10.1134/S0003683816020046. (WOS IF 0,886; SJR IF 0,247; Q3)(0,25/0,15)]

Публикации в прочих изданиях:

1. Tikhonenko S.A., Dubrovskii A.V., **Kim A.L.**, Musin E.V. The New Class of Diagnostic Systems Based on Polyelectrolyte Microcapsules for Urea Detection // Chapter of book Mahendra Rai, Anatoly Reshetilov, Yulia Plekhanova, Avinash P Ingle. *Macro-, Micro-, and Nano-Biosensors: Potential Applications and Possible Limitations*. Springer. 2021. P. 225-237.

Патенты по теме диссертации

1. Тихоненко С.А., Дубровский А.В., **Ким А.Л.**, Мусин Е.В. Диагностическая пластина для определения концентраций мочевины // Патент RU 2 710 268, МПК G01N 33/48, C12Q 1/58 № 2018116022, Заявл. (27.04.2018); Оpubл. (25.12.2019).