

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 543.555, 575.15, 616, 612.466.22, 616.61-008.64

DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.4.347720>

НОВИЙ КОНДУКТОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ АДСОРБОВАНОЇ НА СИЛІКАЛІТІ РЕКОМБІНАНТНОЇ УРЕАЗИ

*С. Марченко*¹, <https://orcid.org/0000-0002-4682-1993>

*Т. Величко*¹, <https://orcid.org/0000-0003-4087-3730>

*О. Солдаткіна*¹, <https://orcid.org/0009-0009-6165-7421>

О. Солдаткін^{1,2}, <https://orcid.org/0000-0003-2362-5487>

*Б. Аката Курч*³, <https://orcid.org/0000-0002-4337-5537>

С. Дзядевич^{1,4}, <https://orcid.org/0000-0003-2915-716X>

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, м. Київ, 03143, Україна

² Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського,
просп. Берестейський, 37, м. Київ, 03056, Україна

³ Близькосхідний технічний університет,

б-р Ісмета Іненю, м. Анкара, 06800, Туреччина

⁴ Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01003, Україна

e-mail: svmarchenkosc@ukr.net, taras.velycho@gmail.com, olgasoldatkina@yahoo.com,
soldatkinsasha@gmail.com, akata@metu.edu.tr, dzyad@yahoo.com

Анотація. Дана експериментальна робота присвячена розробленню нового кондуктометричного біосенсора з покращеними аналітичними характеристиками для кількісної детекції сечовини. Біоселективний елемент біосенсора було виготовлено шляхом адсорбції рекомбінантної уреазы на кондуктометричному перетворювачі, модифікованому тонким шаром нанопористих частинок силікаліту ($d = 250$ нм). Під час розробки біосенсора було вивчено вплив параметрів розчину на його функціонування. Досліджено величину відгуків біосенсора на основі рекомбінантної уреазы в залежності від концентрації білку в аналізованому розчині. Перевірено, як змінюються відгуки запропонованого біосенсора при різній іонній силі та буферній ємності аналізованого розчину. Розроблений біосенсор мав ряд важливих переваг, таких як швидкість відгуку, простота використання, відсутність потреби у застосуванні токсичних агентів при виготовленні, висока відтворюваність сигналів при безперервній роботі ($RSD = 5\%$), розширений лінійний діапазон знаходився в межах 0,02–9 мМ, висока операційна стабільність протягом щонайменше 19 днів зберігання.

Відповідно, враховуючи високі аналітичні параметри розробки, було доведено перспективність застосування біосенсора на основі рекомбінантної уреазы, адсорбованої на силікаліті, для медичної діагностики концентрації сечовини в складних багатокомпонентних біологічних рідинах.

Ключові слова: сечовина, рекомбінантна уреазы, ниркова недостатність, медична діагностика, кондуктометрія, біосенсор, силікаліт, цеоліти

Вступ

В організмі людини сечовина синтезується в печінці як кінцевий продукт детоксикації ендогенного аміаку, що утворюється при розпаді білків та інших азотовмісних сполук. Синтезована сечовина вивільняється з печінки в кров і транспортується до нирок, де вона фільтрується і виводиться із сечею. У нормі концентрація сечовини в крові людини складає від 2,5 до 7,5 мМ [1], але швидкість її синтезу, і відповідно концентрація, частково збільшуються при вживанні понаднормово збагаченою білками їжу, посиленням ендогенним катаболізмом в умовах голодування чи при пошкодженні тканин. Надмірна концентрація сечовини в організмі людини відповідає за різні серйозні захворювання, такі як розлад травлення, підвищена кислотність, виразки [2], рак [3], порушення роботи нирок, ниркова недостатність [4], обструкція сечовивідних шляхів, зневоднення [5], шок, опіки, шлунково-кишкова кровотеча [6] тощо. Відомо, що значно підвищений рівень сечовини (50-150 мМ) в крові вказує на тяжку дисфункцію нирок [7]. Такий аномальний рівень може бути зменшений до близько 10 мМ за допомогою процедур гемодіалізу або перитонеального діалізу [8]. Крім того, рівень сечовини нижче нормально-го може спричинити печінкову недостатність, нефротичний синдром, кахексію тощо [9, 10].

У харчовій промисловості тестування сечовини в молочних продуктах протягом певного періоду є дуже значущим, оскільки це призводить до зниження витрат на корм, більшого виходу молочного білка, зниження фальсифікації [11, 12].

Контроль концентрації сечовини в ґрунтах та водоймах є також важливим для екологічного моніторингу. Певний рівень сечовини в річках або ґрунтових водах свідчить про

забруднення стічними водами [13]. Високий вміст сечовини є однією з причин цвітіння водоростей [14, 15]. Поясненням збільшення цієї речовини у водоймах, є щорічне світове виробництво сечовини, яке перевищує 100 мільйонів тонн, більшість з яких використовується як добриво. Надмірне ж внесення цих азотних добрив може призвести до проблем зі шкідниками, збільшуючи їх чисельність, тривалість життя та загальну пристосованість. Також, сечовина може бути відповідальною за зниження рН ґрунту, що може впливати на врожайність [16]. Таким чином, кількісне та якісне виявлення сечовини становить великий інтерес та є надзвичайно необхідним у галузях харчової промисловості, медицини, охорони навколишнього середовища, тощо.

На сьогоднішній день вже розроблено багато методів аналізу концентрації сечовини, найбільш поширеними є пристрої на основі: газової хроматографії [17], калориметрії [18, 19] та флуориметрії [20]. Однак, недоліками наведених методів є складність попередньої підготовки зразків, довготривалість аналізу, потреба у висококваліфікованому персоналі і неможливість використання запропонованих методів для on-line аналізу.

Альтернативою наведеним вище методам є мініатюрні аналітичні пристрої – біосенсори, використання яких дасть змогу позбавитись вищезазначених недоліків. На даний момент розроблено значну кількість біосенсорів для аналізу сечовини, серед яких потенціометричні [21-23], кондуктометричні [24-26], амперометричні [27-29]. Але, не зважаючи на значну кількість уреазних біосенсорів, всі вони мають два суттєвих недоліки, а саме, вузький лінійний діапазон визначення, що пов'язаний з використанням ензиму уреазы з бобів сої, та вибір найпоширеніших способів іммобілізації,

а саме ковалентного зв'язування [30], фізичної адсорбції [31], поєднання із полімерами [28, 32-33], чи зв'язування із поверхнею перетворювача [34, 35], яким в свою чергу, притаманні такі проблеми як швидка втрата активності іммобілізованого ензиму, низька відтворюваність сигналів біосенсора, проблеми пов'язані з токсичністю агентів іммобілізації, тощо. Для вирішення недоліків існуючих уреазних біосенсорів для визначення сечовини, ми запропонували як біочутливий елемент використовувати рекомбінантну уреазу (РУ) з *E. coli*, що характеризується підвищеною K_m для розширення та зсуву в область високих концентрацій сечовини лінійного діапазону роботи біосенсора. Як іммобілізуючий агент ми запропонували новий носій – цеоліт, а саме один з його різновидів – силікаліт. Оскільки, як вже відомо, цеоліти представляють значний інтерес для іммобілізації білків [36] і особливо різних ензимів завдяки великій площі поверхні, жорсткими і добре визначеними пористими структурами, термостабільності та гідрофільності [37]. Адсорбція ензимів на цеолітах – це м'який та нетоксичний метод іммобілізації, який дозволяє зберегти активність та біодоступність ензимів в складі біосенсорів. Перспективні результати даного методу іммобілізації були отримані для низки ензимних біосенсорів [38-40].

Отже, мета цієї роботи полягала в розробці нового кондуктометричного біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті РУ, що буде характеризуватись значними перевагами у порівнянні з відомими розробками. Впровадження у повсякденну практику нового методу експрес-аналізу концентрації сечовини має життєво важливе значення, особливо для медичної діагностики та екологічного моніторингу довкілля.

Матеріали і методи

У роботі було використано ензим РУ (ЕС 3.5.1.5) з *E. coli*, активністю 150 од. акт./мг білку, виробництва фірми «USBiological» (США), бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V) та сечовину отримано від «Sigma-Aldrich Chemie» (Німеччина), гліцерин виробництва

«Макрохім» (Україна), NaCl отримано від «Sigma-Aldrich» (США) Як буферний розчин використовували однокомпонентний фосфатний буфер на основі KH_2PO_4 , рН якого титрували NaOH фірми «Merck» (Німеччина). Всі інші хімічні речовини, використані в роботі, були вітчизняного виробництва та ступеню чистоти х.ч. або ч.д.а. Для приготування розчинів використовували дистильовану або ультрачисту воду.

Перетворювачі та схема експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань

В роботі використовувались кондуктометричні перетворювачі (КП), виготовлені згідно наших рекомендацій в Інституті фізики напівпровідників імені В.Є. Лашкарьова (м. Київ, Україна). Вони мають розмір 5×30 мм і складаються з двох пар ідентичних золотих гребінчастих електродів, нанесених на ситалову підкладку. Детальний опис конструкції перетворювача та методики його виготовлення і використання приведено в попередній роботі [41].

На рис. 1 представлено схему експериментальної кондуктометричної установки для проведення вимірів з КП. На одну пару електродів (1) наносили робочу мембрану на основі РУ (3). На другу пару електродів (2) наносили референтну мембрану на основі БСА (4). Також кондуктометрична схема включала в себе портативний кондуктометр «МСР-3» (5), тримач для біосенсора (6) і штатив (7). При проведенні вимірювань на основу штативу встановлюють робочу комірку (8) з досліджуваним розчином (9), а весь сенсорний блок встановлюють на магнітний перемішуючий пристрій (10). Портативний вимірювальний прилад «МСР-3» підключається до електромережі через адаптер мережі живлення (11), до біосенсору – сполучними дротами через контакт (12), а до персонального комп'ютера (13) зі встановленим пакетом відповідного програмного забезпечення – через контакт (14). Вимірювання проводили при частоті струму 37 кГц та амплітуді 14 мВ.

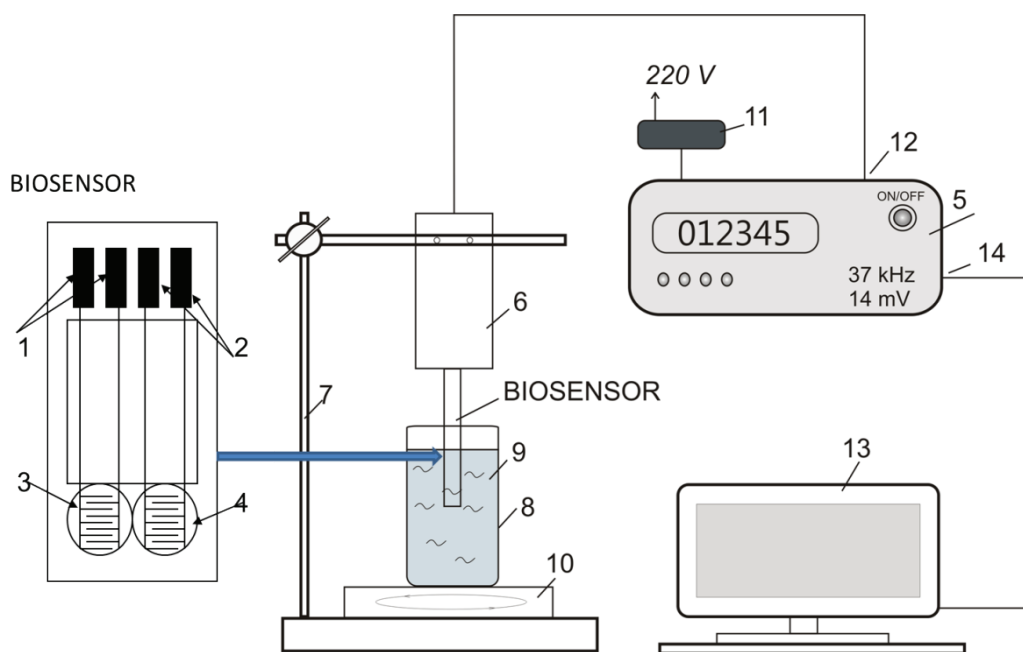


Рис. 1. Схема кондуктометричної установки на основі портативного аналізатора «МСП-3».

Процедура виготовлення біоселективних елементів

Раніше нами було розроблено метод модифікації фізичних перетворювачів з використанням силікаліту. Детальна методика представлена в роботі [42]. Для досліджень використовували КП, попередньо покриті силікалітом. На одну пару електродів наносили 0,15 мкл 5% розчину РУ у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,5, а на іншу (еталонну) пару – 0,15 мкл 5% розчину БСА в аналогічному буфері, після чого перетворювач піддавали повному висушуванню на повітрі (протягом 15-20 хв). Після іммобілізації біосенсор промивали свіжими порціями фосфатного буферного розчину протягом 10–15 хв для видалення незв'язаних компонентів біомембран. Між вимірюваннями біосенсор зберігали в сухому стані за температури +4°C.

Методика проведення біосенсорних вимірювань

Вимірювання проводили за кімнатної температури у відкритій вимірювальній комірці (2 мл), заповненій робочим буферним розчином (10 мМ фосфатний буферний розчин, рН 7,35)

при постійному перемішуванні. Необхідну концентрацію модельного розчину сечовини для вимірювань в комірці отримували шляхом додавання аліквот стокового розчину сечовини до буферного розчину. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з локальними змінами температури, рН і випадковими електричними струмами, усувалися за допомогою використання диференційного режиму вимірювання.

Результати і обговорення

Характеристика силікаліту

Отримані зразки наночастинок силікаліту були охарактеризовані за допомогою рентгенівської дифракції на приладі Philips PW 1729 та з використанням скануючої електронної мікроскопії (СЕМ) на приладі 400 Quant FEI.

Площу поверхні зразків було визначено за допомогою багатоточкового БЕТ-аналізу, тоді як розмір пор було отримано методами Сайто-Фолі (С-Ф) та t-діаграми. Морфологію та середній розмір наночастинок силікаліту можна побачити на рис. 2.

Виходячи з різних методів досліджень, більш детальні параметри синтезованого силікаліту наведені в табл. 1.

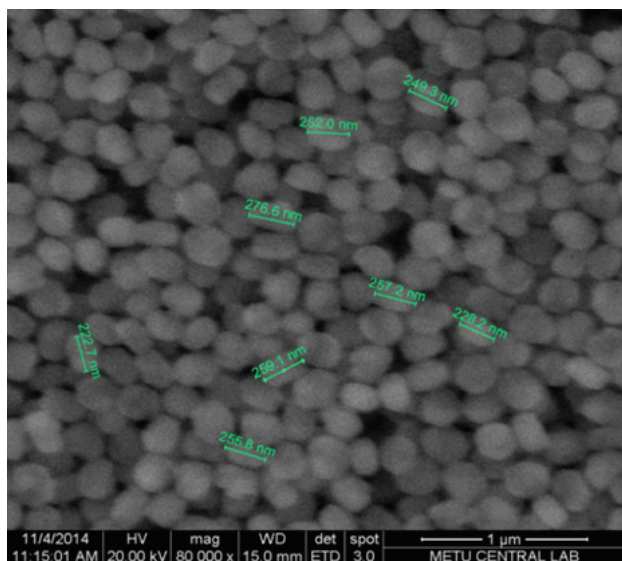


Рис. 2. Морфологія частинок силікаліту за результатами СЕМ.

Табл. 1

Характеристика наночастинок силікаліту

Розмір частинок	Площа поверхні	Розмір пор
≈250 нм	296 м²/г	0,42 нм
СЕМ	С-Ф метод	С-Ф метод

Вплив параметрів розчину на функціонування біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті РУ

Принцип роботи запропонованого в роботі кондуктометричного біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті РУ, ґрунтується на ензиматичній реакції, представлений рівнянням:



В процесі проходження ензиматичної реакції збільшується локальна концентрація іонів в мембрані. Це, відповідно, призводить до зміни провідності розчину, яка реєструється кондуктометричним перетворювачем [42]. Ці зміни і, відповідно, відгуки біосенсора є пропорційними до концентрації аналізованого субстрату, тобто сечовини.

Як вже згадувалось, в основі кондуктометричного методу лежить вимірювання зміни

провідності аналізованого розчину. Ця зміна провідності може залежати як від самої ензиматичної реакції, так і від характеристик розчину, в якому ця реакція відбувається. Тому передусім було досліджено вплив параметрів розчину (буферна ємність, іонна сила, концентрація білку в розчині) на величину відгуку біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті РУ.

Буферна ємність крові людини є відносно високою завдяки наявності великих концентрацій білків та солей у ній. Щоб уникнути впливу буферної ємності крові на функціонування кондуктометричного біосенсора, концентрація робочого буфера у вимірювальній комірці повинна бути не менше 5 мМ. На рис. 3 наведено залежності величин відгуків біосенсора від концентрації сечовини за різних концентрацій робочого буферного розчину (2,5; 5; 10; 25 мМ).

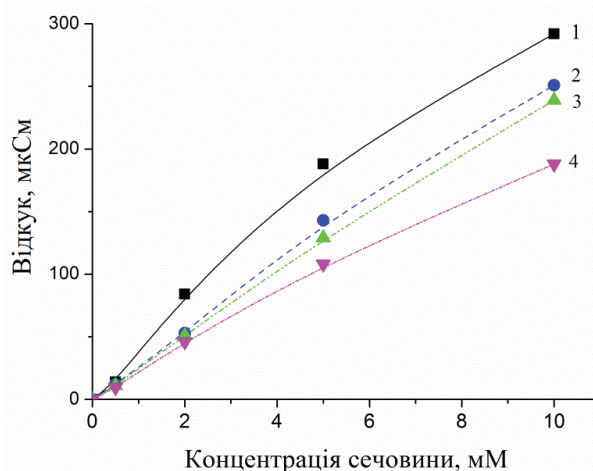


Рис. 3. Залежність величин відгуків біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті РУ на різні концентрації сечовини при різних концентраціях робочого буферного розчину (1 – 2,5 мМ, 2 – 5 мМ, 3 – 10 мМ та 4 – 25 мМ). Вимірювання проводились у фосфатному буфері, pH 7,35.

З графіка видно, що зі збільшенням буферної ємності величина відгуків на сечовину зменшується. Зниження відгуків на субстрат у разі збільшення концентрації робочого буферного розчину пов'язано зі зростанням фонові провідності та буферної ємності. Як видно, зі збільшенням буферної ємності, відгуки біосен-

сера на сечовину зменшуються, але не принципово, тож для подальших досліджень було використано концентрацію робочого буфера 10 мМ.

Однією з важливих характеристик буферного розчину, що може негативно впливати на відгук кондуктометричного біосенсора, є іонна сила. Відомо, що сольовим компонентом крові є хлорид натрію з концентрацією близько 150 мМ. Щоб дослідити цей вплив, було проведено вимірювання величини сигналу біосенсора на сечовину при додаванні у аналізований розчин різних концентрацій NaCl (від 1 до 350 мМ) (рис. 4).

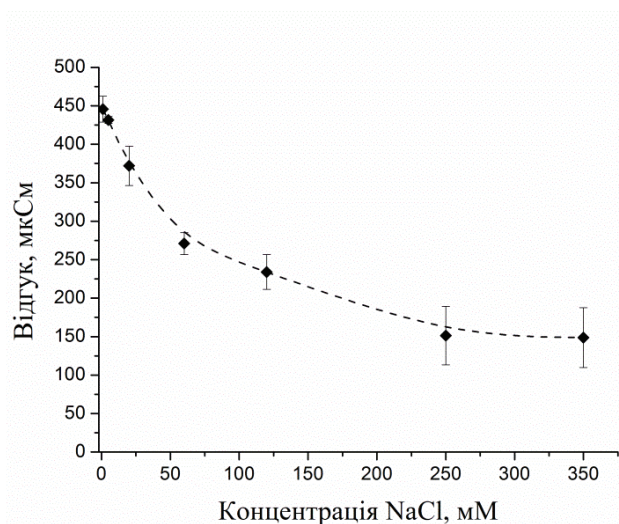


Рис. 4. Залежність величин відгуків біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті РУ від концентрації NaCl у аналізованому середовищі. Вимірювання проводились у 10 мМ фосфатному буфері, pH 7,35. Концентрація сечовини становила 10 мМ.

З отриманого графіка видно, що зі збільшенням іонної сили відгук на концентрацію субстрату зменшується за експонентою. При концентрації 350 мМ NaCl у робочому буферному розчині, величина сигналу становить лише 34% від початкового відгуку на сечовину без додавання NaCl у комірку. Одна з головних причин такої залежності пов'язана зі зростанням фонові провідності розчину.

Відомо, що на нормальне функціонування електрохімічних біосенсорів часто негативно може впливати наявність білків в аналізованому середовищі за рахунок механічного

забруднення біомембран, а відповідно зменшення їх проникності. Враховуючи можливе неспецифічне зв'язування іммобілізованої РУ з білками крові, що може впливати на результати аналізу з використанням біосенсора, ми дослідили зміну чутливості біосенсора на різні концентрації сечовини при додаванні різних концентрацій БСА в аналізоване середовище (Табл.2).

Табл. 2

Залежність величини сигналів біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті РУ від концентрації БСА в розчині

Концентрація сечовини, мМ	Відгуки біосенсора за різних концентрацій БСА, мкСм				
	0%БСА	0,1%БСА	0,25%БСА	0,5%БСА	1%БСА
0,5	48	45	46	45	46
2	151	155	158	158	149
5	262	271	271	270	257
10	357	369	369	365	349
15	416	423	429	427	414
25	515	509	506	507	493

Аналізуючи результати експерименту, встановлено, що біосенсорного сигналу на внесення БСА у вимірювальну комірку не спостерігалось, і не було виявлено істотного впливу БСА на величину відгуків кондуктометричного біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті РУ. Отже, присутність високомолекулярної фракції білку в робочому буфері у концентраціях що можуть бути присутні в реальних біологічних рідинах (з врахуванням розведення) не призводить до виникнення неспецифічного відгуку та не впливає на величину відгуку біосенсора на основі РУ, адсорбованої на силікаліті.

Стабільність функціонування біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті РУ

Відтворюваність та операційна стабільність є одними з найважливіших характерис-

тик стабільної роботи біосенсорів. Для дослідження відтворюваності ми протягом одного робочого дня, з інтервалом у 30 хв, отримували відгуки біосенсора на одну й ту саму концентрацію субстрату (10 мМ). При цьому біосенсор весь час між вимірюваннями залишався у робочому буфері з постійним перемішуванням. Відносне стандартне відхилення при біосенсорному вимірюванні концентрації сечовини складало 5%, що є прийнятним (рис. 5). Саме тому запропонований біосенсор на основі адсорбованої на силікаліті РУ має високу перспективність застосування для аналізу сечовини у реальних біологічних зразках хворих.

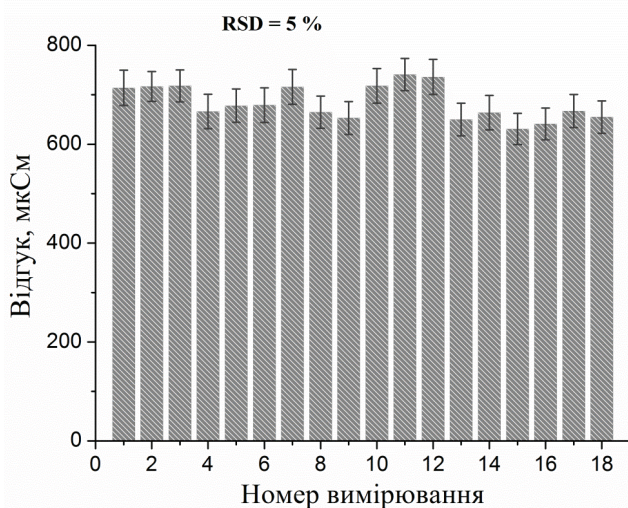


Рис. 5. Відтворюваність сигналів біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті РУ протягом одного робочого дня при безперервній роботі.

**Концентрація сечовини – 10 мМ.
Вимірювання проводились у 10 мМ
фосфатному буфері, рН 7,35.**

Поширеним недоліком біосенсорів на основі методів іммобілізації по принципу фізичної адсорбції ензимів є те, що останні можуть поступово вимиватися робочим розчином через слабкий зв'язок між ензимом та адсорбентом. Тому важливо було перевірити стабільність роботи біосенсора протягом певного часу. З цією метою, ми протягом 19 днів експерименту отримували по 5 відгуків уреазного біосенсора на однакову концентрацію сечовини. Під час експерименту, між вимірюваннями,

біосенсор зберігався за кімнатної температури у сухому стані. За період тестування відгуки біосенсора не зазнали значної втрати активності, що є дуже гарним показником операційної стабільності (рис. 6).

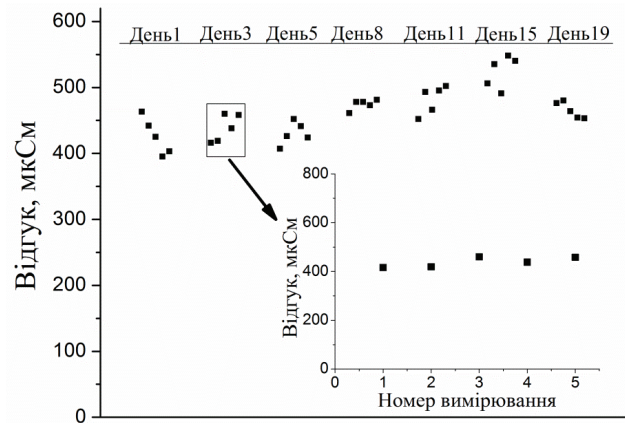


Рис. 6. Операційна стабільність сигналів біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті РУ протягом 19 днів функціонування.

**Концентрація сечовини – 10 мМ.
Вимірювання проводились у 10 мМ
фосфатному буфері, рН 7,35.**

З метою вивчення аналітичних параметрів біосенсора для можливості подальшого аналізу сечовини в біологічних рідинах було проаналізовані типові сигнали біосенсора на різні концентрації сечовини та побудована детальна калібрувальна крива (рис. 7).

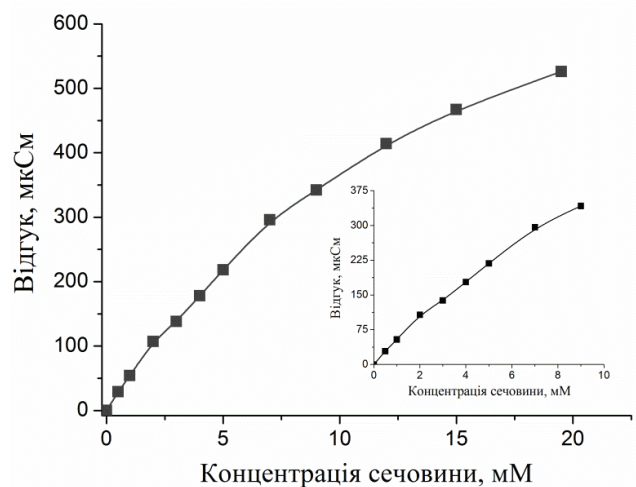


Рис. 7. Залежність величини відгуку біосенсора на основі адсорбованої на силікаліті РУ від концентрації сечовини в розчині. Вимірювання проводились у 10 мМ фосфатному буфері, рН 7,35.

Теоретично, лінійна ділянка цієї калібрувальної кривої може бути використана надалі для аналізу концентрації сечовини в реальних біологічних зразках хворих на ниркову недостатність. Отримані відгуки та побудовану калібрувальну криву аналізували стосовно їх аналітичних характеристик: динамічного діапазону роботи, який знаходився в межах 0-20 мМ, лінійний діапазон складав 0,02-9 мМ сечовини, мінімальна межа детекції сечовини дорівнювала 20 мкМ.

Розроблений біосенсор на основі адсорбованої на силікаліті РУ характеризується відмінними аналітичними характеристиками, є високо стабільним при роботі та селективним до цільового субстрату відносно найбільш впливових інтерферентів крові. Відповідно, в подальшому, він може з успіхом використовуватись при аналізі сироватки крові/діалізної рідини пацієнтів із захворюванням нирок.

Висновки

Дана експериментальна робота була спрямована на розробку, адаптацію та оптимізацію нового моноензимного кондуктометричного біосенсора для визначення сечовини в модельних та реальних біологічних зразках. Біосенсор створений на основі РУ з *E. coli* і призначений для точного визначення концентрації сечовини в діалізній рідині та сироватці крові хворих на ниркову недостатність. Біосенсор було створено шляхом іммобілізації РУ на чутливій поверхні гребінчастих електродів кондуктометричного перетворювача з використанням методики адсорбції на силікаліті.

В процесі дослідження було перевірено вплив різних концентрацій буферу на відгуки кондуктометричного біосенсора, хлориду натрію та різних концентрацій білку як основних складових компонентів сироватки крові, які можуть впливати на результати вимірювання. Показана відсутність інтерференції з боку компонентів матриці. Біосенсор характеризувався хорошою відтворюваністю відгуків на додавання модельного розчину сечовини (RSD=5 %) та високою операційною стабільністю сигналів протягом 19 діб.

З метою перевірки можливості подальшого застосування розробленого біосенсора для детекції сечовини в реальних біологічних зразках, було проаналізовано його аналітичні характеристики. Лінійний діапазон роботи біосенсора знаходився в широких вимірювальних межах від 0,02 до 9 мМ, мінімальна межа визначення – 20 мкМ. Показано значне розширення лінійного діапазону визначення сечовини внаслідок застосування рекомбінантного ензиму. Це дає змогу проводити вимірювання зразків, що містять високу концентрацію сечовини, без значного їх розведення.

Таким чином, кондуктометричний біосенсор на основі РУ з *E. Coli*, адсорбованої на силікаліті, можна розглядати як перспективний аналітичний інструмент для високочутливого визначення концентрації сечовини в реальних біологічних зразках хворих на ниркову недостатність.

Подяки

Дослідження виконувалось за фінансової підтримки гранту Фонду Саймонса № SFI-PD-Ukraine-00017453 та індивідуальних грантів від FEBS “New multibiosensor device for diagnosis of early diabetic nephropathy and hemodialysis control” і дослідницької стипендії IUBMB Wood-Whelan “Development of new biosensors based on modified carbonaceous materials for sorbitol measurement as the main marker of diabetic complications”.

Список використаної літератури

- [1]. G. Dhawan, G. Sumana, B. D. Malhotra. Recent developments in urea biosensors // Biochem. Eng. J., 44(1), p. 42–52 (2009).
- [2]. A.-S. F. Nktel, M. H. Nadhim, H.Y. Nawar. Serological, culture and urea breath test for detection of *H. pylori* in gastric ulcers patients // Indian J Forensic Med Toxicol., 14(4), p. 1317-1322 (2020).
- [3]. E. Wu, G.-F. Wei, Y. Li, M.-K. Du, J.-T. Ni. Serum urea concentration and risk of 16 site-specific cancers, overall cancer, and cancer mortality in individuals with metabolic syndrome: a cohort study // BMC Medicine, 22:536 (2024).

- [4]. O. I. Adeyomoye, C. O. Akintayo, K. P. Omotuyi, A. N. Adewumi. The biological roles of urea: A review of preclinical studies // *Indian J. Nephrol.*, 32(6), p. 539-545 (2022).
- [5]. A. R. Mehta. Why does the plasma urea concentration increase in acute dehydration? // *Adv. Physiol. Educ.*, 32(4), p. 336 (2008).
- [6]. M. D. Witting, L. Magder, A. E. Heins, A. Mattu, C. A. Granja, M. Baumgarten. ED predictors of upper gastrointestinal tract bleeding in patients without hematemesis // *Am. J. Emerg. Med.*, 24, p. 280-285 (2006).
- [7]. R. Vanholder, T. Gryp, G. Glorieux. Urea and chronic kidney disease: the comeback of the century? (in uraemia research) // *Nephrol. Dial. Transplant.*, 33(1), pp. 4-12 (2018).
- [8]. R. Koncki. Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis // *Anal. Chim. Acta*, 599(1), p. 7-15 (2007).
- [9]. D. Chirizzi, C. Malitesta. Potentiometric urea biosensor based on urease immobilized by an electrosynthesized poly (ophenylenediamine) film with buffering capability // *Sens. Actuators, B*, 157(1), p. 211-215 (2011).
- [10]. D. Fink, G. M. Hernandez, L. Alfonta. Ion track-based urea sensing // *Sens. Actuators, B*, 156 (1), p. 467-70 (2011).
- [11]. J. H. Santos Neto, L. O. dos Santos, A. M. P. dos Santos, C. G. Novaes, S. L. Costa Ferreira. A new and accessible instrumentation to determine urea in UHT milk using digital image analysis // *Food Chem.*, 381 (1), 132221 (2022).
- [12]. F. Shalileh, H. Sabahi, M. Dadmehr, M. Hosseini. Sensing approaches toward detection of urea adulteration in milk // *Microchem. J.*, 193, 108990 (2023).
- [13]. L. E. Scherger, V. Zanello, C. Lexow. Impact of Urea and Ammoniacal Nitrogen Wastewaters on Soil: Field Study in a Fertilizer Industry (Bahía Blanca, Argentina) // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 107, p. 565-573 (2021).
- [14]. C. J. Gobler, A. Burson, F. Koch, Y. Tang, M. R. Mulholland. The role of nitrogenous nutrients in the occurrence of harmful algal blooms caused by *Cochlodinium polykrikoides* in New York estuaries (USA) // *Harmful Algae*, 17, p. 64-74 (2012).
- [15]. K. Lu, Z. Liu, R. Dai, W.S. Gardner. Urea dynamics during Lake Taihu cyanobacterial blooms in China // *Harmful Algae*, 84, p. 233-243 (2019).
- [16]. D. Curtin, M.E. Peterson, W. Qiu, P.M. Fraser. Predicting soil pH changes in response to application of urea and sheep urine // *J. Environ. Qual.*, 49(5), p.1445-1452 (2020).
- [17]. K. Y. Tserng, S. C. Kalhan. Gas chromatography/mass spectrometric determination of [15N]urea in plasma and application to urea metabolism study // *Anal. Chem.*, 54 (3), p. 489-491 (1982).
- [18]. C.J. Patton, S.R. Crouch. Spectrophotometric and Kinetics Investigation of the Berthelot Reaction for the Determination of Ammonia // *Anal. Chem.*, 49 (3), pp. 464-469 (1977).
- [19]. D.E. Gaddes, M.C. Demirel, W.B. Reeves, S. Tadigadapa. Remote calorimetric detection of urea via flow injection analysis // *Analyst*, 140(23), p. 8033-8040 (2015).
- [20]. M. S. Abdel-Latif, G. G. Guilbault. Fluorometric determination of urea by flow injection analysis // *J. Biotechnol.*, 14 (1), p. 53-61 (1990).
- [21]. D. Liu, M. E. Meyerhoff, H. D. Goldberg, R. B. Brown. Potentiometric ion- and bioselective electrodes based on asymmetric polyurethane membranes // *Anal. Chim. Acta*, 274 (1), pp. 37-46 (1993).
- [22]. S. B. Adeloju, S. J. Shaw, G. G. Wallace. Polypyrrole-based potentiometric biosensor for urea. Part 2. Analytical optimization // *Anal. Chim. Acta*, 281 (3), p. 621-627 (1993).
- [23]. B. Lakard, G. Herlem, S. Lakard, A. Antoniou, B. Fahys. Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films // *Biosens. Bioelectron.*, 19 (12), p. 1641-1647 (2004).
- [24]. K. Chen, D. Liu, L. Nie, S. Yao. Determination of urea in urine using a conductivity cell with surface acoustic wave resonator-based measurement circuit // *Talanta*, 41 (12), p. 2195-2200 (1994).
- [25]. H. Sangodkar, S. Sukeerthi, R.S. Srinivasa, R. Lal, Q. Contractor. A biosensor array

based on polyaniline // *Anal. Chem.*, 68 (5), p. 779–783 (1996).

[26]. A. S. Jdanova, S. Poyard, A. P. Soldatkin, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet. Conductometric urea sensor. Use of additional membranes for the improvement of its analytical characteristics // *Anal. Chim. Acta*, 321(1), p. 35–40 (1996).

[27]. S. B. Adeloju, S. J. Shaw, G. G. Wallace. Polypyrrole-based amperometric flow injection biosensor for urea // *Anal. Chim. Acta*, 323, p. 107–113 (1996).

[28]. S. B. Adeloju, S. J. Shaw, G. G. Wallace. Pulsed-amperometric detection of urea in blood samples on a conducting polypyrrole-urease biosensor // *Anal. Chim. Acta*, 341, p. 155–160 (1997).

[29]. Rajesh, V. Bisht, W. Takashima, K. Kaneto. An amperometric urea biosensor based on covalent immobilization of urease onto an electrochemically prepared copolymer poly (N-3-aminopropyl pyrrole-co-pyrrole) film // *Biomaterials*, 26 (17), p. 3683–3690 (2005).

[30]. K. Yoneyama, Y. Fujino, T. Osaka, I. Satoh. Amperometric sensing system for the detection of urea by a combination of the pH-stat method and flow injection analysis // *Sens. Actuators B Chem*, 76, p. 152–157 (2001).

[31]. M. Kanungo, A. Kumar, A.Q. Contractor. Studies on electropolymerization of aniline in the presence of sodium dodecyl sulfate and its application in sensing urea // *J. Electroanal. Chem.*, 528, p. 46–56 (2002)

[32]. C. Jiménez, J. Bartrol, N. F. De Rooij, M. Koudelka-Hep. Use of photopolymerizable membranes based on polyacrylamide hydrogels for enzymatic microsensor construction // *Anal. Chim. Acta*, 351, p. 169–176 (1997).

[33]. S. Komaba, M. Seyama, T. Momma, T. Osaka. Potentiometric biosensor for urea based on electropolymerized electroinactive polypyrrole // *Electrochim. Acta*, 42 (3), pp. 383–388 (1997).

[34]. N. Tinkilic, O. Cubuk, I. Isildak. Glucose and urea biosensors based on all solid-state PVC–NH₂ membrane electrodes // *Anal. Chim. Acta*, 452, p. 29–34 (2002).

[35]. M. L. Hamlaoui, K. Reybier, M. Marrakchi, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet,

R. Kherrat, A. Walcarius. Development of a urea biosensor based on a polymeric membrane including zeolite // *Anal. Chim. Acta*, 466 (1), p. 39–45 (2002).

[36] Wu J., Li X., Yan Y., Hu Y., Zhang Y., Tang Y. Protein adsorption onto nanozeolite: Effect of micropore openings // *J. Coll. Interface Sci.*, 2013, 406, p. 130–138.

[37]. Kaur B., Srivastava R. Synthesis of ionic liquids coated nanocrystalline zeolite materials and their application in the simultaneous determination of adenine, cytosine, guanine, and thymine // *Electrochim. Acta*, 2014, 133, p. 428–439.

[38]. B. Liu, R. Hu, J. Deng. Characterization of immobilization of an enzyme in a modified Y zeolite matrix and its application to an amperometric glucose biosensor // *Anal. Chem.*, 69 (13), p. 2343–2348 (1997).

[39]. B. Liu, Z. Liu, D. Chen, J. Kong, J. Deng. An amperometric biosensor based on the coimmobilization of horseradish peroxidase and methylene blue on a beta-type zeolite modified electrode // *Fresenius. J. Anal. Chem.* 367 (6), p. 539–544 (2000).

[40]. O. O. Soldatkin, I. S. Kucherenko, S. V. Marchenko, B. Ozansoy Kasap, B. Akata, A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych. Application of enzyme/zeolite sensor for urea analysis in serum // *Mater. Sci. Eng. C*, 42, p. 155–160 (2014).

[41]. O. O. Soldatkin, I. S. Kucherenko, V. M. Pyeshkova, A. L. Kukla, N. Jaffrezic-Renault, A. V. El'skaya, S. V. Dzyadevych, A.P. Soldatkin. Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions // *Bioelectrochemistry*, 83 (1), p. 25–30 (2012).

[42]. I. S. Kucherenko, O. O. Soldatkin, B. O. Kasap, S. Öztürk, B. Akata, A. P. Soldatkin, S.V. Dzyadevych. Elaboration of Urease Adsorption on Silicalite for Biosensor Creation // *Electroanalysis*, 24 (6), p. 1380–1385 (2012).

[43]. N. Jaffrezic-Renault, S.V. Dzyadevych. Conductometric microbiosensors for environmental monitoring // *Sensors*, 8 (4), p. 2569–2588 (2008).

Стаття надійшла до редакції 15.10.2025 р.

UDC 543.555,575.15,616,612.466.22,616.61-008.64
DOI: <https://doi.org/10.18524/1815-7459.2025.4.347720>

A NEW CONDUCTOMETRIC BIOSENSOR BASED ON RECOMBINANT UREASE ADSORBED ON SILICALITE

S. Marchenko¹, T. Velychko¹, O. Soldatkina¹, O. Soldatkin^{1,2}, B. Akata Kurç³, S. Dzyadevych^{1,4}

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine,
150 Akademika Zabolotnoho St, Kyiv, 03680, Ukraine

²National Technical University of Ukraine “Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute”,
37 Beresteyskyi Ave, Kyiv, 03056, Ukraine

³Middle East Technical University,

İsmet İnönü Blvd, Ankara, 06800, Turkey

⁴Taras Shevchenko National University of Kyiv,
64 Volodymyrska St, Kyiv, 01003, Ukraine

e-mail: svmarchenkosc@ukr.net, taras.velychko@gmail.com, olgasoldatkina@yahoo.com,
soldatkinsasha@gmail.com, akata@metu.edu.tr, dzyad@yahoo.com

Abstract. This experimental work is devoted to the development of a new conductometric biosensor with improved analytical characteristics for the quantitative detection of urea. The bioselective element of the biosensor was manufactured by adsorption of recombinant urease on a conductometric transducer modified with a thin layer of nanoporous silicalite particles ($d = 250$ nm). During the development of the biosensor, the influence of solution parameters on its functioning was studied. Namely, the magnitude of the responses of the biosensor based on recombinant urease depending on the protein concentration in the analyzed solution was studied. It was checked how the responses of the proposed biosensor change at different ionic strength and buffer capacity of the analyzed solution. The developed biosensor had a number of important advantages, such as fast response, ease of use, no need to use toxic agents during fabrication, high signal reproducibility during continuous operation (RSD = 5%), extended linear range within 0.02–9 mM, and high operational stability for at least 19 days of storage. Accordingly, taking into account the good analytical parameters of the development, the high prospect of using the biosensor based on recombinant urease adsorbed on silicalite for medical diagnostics of urea concentration in complex multicomponent biological fluids was proven.

Keywords: urea, recombinant urease, kidney failure, medical diagnostics, conductometry, biosensor, silicalite, zeolites