

# АПЛІКАЦІЙНА ФОРМА УКРАЇНСЬКО-ПОЛЬСЬКОГО НАУКОВОГО ПРОЄКТУ

В РАМКАХ УГОДИ ПРО НАУКОВЕ СПІВРОБІТНИЦТВО МІЖ  
НАЦІОНАЛЬНОЮ АКАДЕМІЄЮ НАУК УКРАЇНИ ТА ПОЛЬСЬКОЮ АКАДЕМІЄЮ НАУК

**Назва проєкту: Фізико-хімічна характеристика синтетичних каталітичних наноматеріалів, придатних для конструювання біосенсорів.**

**Назва базового фундаментального або прикладного дослідження установи НАН України в рамках якого виконуватиметься проєкт:** Конструювання біосенсорів та біопаливних комірок на основі поєднання мікробних клітин – надпродуцентів оксидоредуктаз, очищених ферментів та нанокompозитних матеріалів

Виконавці від ПАН:

Виконавці від НАНУ:

<b>Інститут:</b> Інститут фізичної хімії Польської академії наук	<b>Інститут:</b> Інститут біології клітини Національної академії наук України
<b>Поштовий код і адреса:</b> вул. Каспшака 44/52, 01-224 Варшава, Польща	<b>Поштовий код і адреса:</b> вул. Драгоманова 14/16, 79005, Львів, Україна
<b>Керівник проєкту:</b> Войцех Ногала, д-р. філософії (PhD), інж.	<b>Керівник проєкту:</b> Михайло Гончар, д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України
☎ +48 22 343 3375	☎ +38 032-261-2144
Факс: 22 343 3333; 22 632 5276	Факс: 38 032 266 23 79
e-mail: wnogala@ichf.edu.pl	e-mail: mykhailo1952@gmail.com
<b>Персональні учасники проєкту:</b> Сильвестер Гавінковські, доктор філософії (PhD), керівник групи молекулярної нанофотоники, Інститут фізичної хімії Польської академії наук. Марцін Голдинський, доктор філософії (PhD), інж., керівник лабораторії сканувальної електронної мікроскопії, Інститут фізичної хімії Польської академії наук. Вайшалі Шривастав, аспірант відділу електродних процесів, Інститут фізичної хімії Польської академії наук.	<b>Персональні учасники проєкту:</b> Наталія Стасюк, д.б.н., науковий співробітник, заступник директора з наукової роботи Інституту біології клітини НАН України. Андрій Закальський, к.б.н., доцент; науковий співробітник відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України. Ольга Демків, к.б.н., науковий співробітник відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України. Юлія Наум, інженер відділу аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України.

**Початок: 2025**

**Термін: 2025-2027**

## АНОТАЦІЯ:

Галузь: Біотехнологія, ензимологія, нанотехнологія, біоелектрохімія

**Опис проєкту:** Заплановане дослідження «Фізико-хімічна характеристика синтетичних каталітичних наноматеріалів, придатних для біосенсорів та біопаливних елементів» стосується кількох суміжних дисциплін (ензимології, фізичної хімії, нанотехнологій та біоелектрохімії) і спрямоване на створення нових біоелементів для біосенсорів із використанням наноматеріалів.

Метою проєкту є розробка нових методів отримання біоселективних наноелементів, які складаються з ензимів/клітин і наноносіїв, їх структурно-функціональна характеристика, а також дослідження можливості використання біофункціональних наноструктур для конструювання біосенсорів. Як показано в наших останніх публікаціях [1-4], використання нових провідних наноматеріалів дає можливість покращення аналітичних характеристик біосенсорів.

Досконалість та оригінальність проєкту ґрунтуються на ідеї використання комерційно недоступних ензимів класу оксидоредуктаз. Цільові ензими, в тому числі рекомбінантні, будуть очищені з клітин мікробних надпродуцентів та іммобілізовані на новітніх наноматеріалах (або ко-іммобілізовані з ними на поверхні електродів) і будуть використані для побудови амперометричних біосенсорів. Особливістю запропонованого наукового проєкту є міждисциплінарний характер.

### Деякі науково-технічні цілі проєкту визначено наступним чином:

1. Одержати нові металеві наночастинки (НЧ) шляхом хімічного синтезу.
2. Одержати НЧ з каталітичними властивостями шляхом кон'югації з оксидоредуктазами (біоНЧ).
3. Охарактеризувати властивості отриманих біоНЧ із застосуванням високотехнологічних фізичних методів.
4. Розробити та охарактеризувати нові електроди на основі біоНП для амперометричних біосенсорів.

Основною ідеєю дослідження є створення нових біокаталізаторів на основі традиційних і нових нанобіоматеріалів для побудови амперометричних біосенсорів (АБС). Різноманітні електрохімічно активні наноматеріали, включаючи наночастинки (НЧ) шляхетних і перехідних металів, будуть використовуватися як носії для іммобілізації ензимів/клітин. Останнім часом НЧ мають величезне наукове та практичне значення як для фундаментальних досліджень, так і для потенційного застосування в медицині та індустрії високих технологій. У поточному проєкті металеві НЧ, отримані золь-гель методом, будуть модифіковані введенням додаткових функціональних груп ( $-NH_2$ ,  $-COOH$ ) з подальшою біофункціоналізацією ензимами/клітинами за допомогою біфункціональних реагентів.

Ми плануємо розробити нові високоселективні, чутливі та стабільні АБС з використанням наступних оксидоредуктаз: галактозооксидази (ГАО), алкогольоксидази (АО) та саркозиноксидази (СОХ). Для цього, високоочищені ензими і генетично модифіковані дріжджові клітини - надпродуценти цільового ензима, будуть іммобілізовані на поверхні електродів шляхом включення в полімерні матриці. Оптимізована матриця, що містить НЧ, дозволить підвищити локальну концентрацію ензима, а також підвищити стабільність ензиму, що критично важливо для застосування таких біокаталізаторів у конструюванні АБС. Мотивація використання клітинних каталізаторів здебільшого пов'язана з відсутністю деяких оксидоредуктаз на комерційному ринку, а також тому, що вони є економічною альтернативою очищеному ензиму.

У запланованих дослідженнях ГАО, АО (або дріжджові клітини як продуценти) і СОХ, кон'юговані з НЧ (біоНЧ), будуть охарактеризовані в аспекті їх структурно-функціональних властивостей: каталітичних параметрів, селективності відповідей на відповідні субстрати, функціональна стабільність і стабільність при зберіганні. Особливу увагу буде приділено вивченню можливих переваг біоНЧ порівняно з їх мікроаналогами, зокрема можливості прямого (безмедіаторного) електрохімічної комунікації між ензимом та поверхнею електрода в окисно-відновних системах, а саме біоселективних мембранах. Нещодавно ми продемонстрували, що кон'югація пероксидази з НЧ благородних металів призвела до значного посилення електрохімічного сигналу, вищої стабільності безмедіаторного АБС, а також до розширення діапазону лінійності детекції гідроген пероксиду та вищої чутливості біоелектрода [5]. Згідно з нашими попередніми результатами, деякі композиції двокомпонентних гібридних НЧ можуть бути перспективними хемосенсорами для хемодетекції гідроген пероксиду.

Оптимізовані біоселективні мембрани (містять оксидоредуктази, іммобілізовані на найбільш ефективних НЧ) будуть випробувані як сенсорні елементи лабораторних прототипів аналізаторів для аналізу практично важливих аналітів – галактози, первинних спиртів, саркозину, важливих метаболітів у клінічній діагностиці та важливих компонентів харчових продуктів.

Використання наноматеріалів як носіїв ензимів/клітин дозволить отримати якісно нові характеристики біокаталізаторів, а особливо для ензимів – підвищену здатність до прямого переносу електронів на

поверхню перетворювача. Очікується, що поєднання нових біо- та нанотехнологій дасть можливість створювати нові матеріали та розробляти нові безмедіаторні біосенсори.

Основні очікувані результати:

- 1) Будуть запропоновані нові підходи синтезу та функціоналізації НЧ. Буде отримано та охарактеризовано моно- та бі-металеві НЧ, що містять 2-3 різні шляхетні або перехідні метали.
- 2) Високоочищені активні оксидоредуктази - алкогольоксидаза (АО) і галактозооксидаза (ГАО) - будуть виділені з відповідних надпродуцентів - штамів дріжджів (*Ogataea polymorpha*) і грибів (*Fusarium oxysporum*).
- 3) Нові біофункціоналізовані НЧ (біоНЧ) буде отримано шляхом іммобілізації ензимів (АО, СОХ і ГАО) або відповідних мікробних клітин на поверхні різних функціоналізованих НЧ. Отримані біоНЧ будуть охарактеризовані в аспекті їх структури, фізико-хімічних та каталітичних властивостей.
- 4) Найбільш ефективні (каталітично активні та стабільні) біоНЧ на основі АО, СОХ та ГАО будуть досліджені як біорозпізнавальні елементи амперометричних біосенсорів, чутливих до аналітів (первинних спиртів, саркозину та галактози, відповідно), будуть сконструйовані та протестовані на реальних зразках харчових продуктів.

Наші висновки можуть згодом стати важливими для фундаментальних і прикладних природничих наук. Очікуваний результат проекту виходить за рамки існуючого рівня техніки, і очікується, що внаслідок реалізації проекту буде отримано інноваційні результати. Будуть підготовлені до публікації спільні статті (або патенти) і тези міжнародних конференцій, які узагальнюють отримані результати. Враховуючи перелічені переваги біоНЧ, можна зробити висновок, що науковий, екологічний, соціальний та економічний вплив проекту буде значним.

Програма дослідження складається з наступних завдань:

**Завдання 1. Культивування клітин дріжджів і грибів; виділення та очищення оксидоредуктаз – перспективних біокаталізаторів для конструювання біосенсорів.**

1.1. Дріжджові клітини або клітини грибів, надпродуценти цільових ензимів, будуть культивовані в оптимальних умовах.

1.2. Ензими алкогольоксидаза (АО) і галактозооксидаза (ГАО) будуть виділені та хроматографічно очищені з дріжджових або грибкових клітин. Очищені ензими та клітини, а також комерційну саркозиноксидазу (SAO) буде використано для побудови біосенсорів.

*За цей етап відповідає українська команда.*

**Задача 2. Синтез, хімічна функціоналізація наночастинок різного походження, їх кон'югація ензимами або клітинами та структурна характеристика отриманих нанобіоматеріалів.**

2.1. Дизайн, хімічний синтез та характеристика металевих НЧ.

2.2. Тестування впливу синтезованих НЧ на ензиматичну активність цільових ензимів.

2.3. Розробка відповідних методик іммобілізації ензимів на наноконструкціях.

2.4. Іммобілізація очищених ензимів з використанням обраних оптимальних НЧ.

2.5. Фізична та фізико-хімічна характеристика отриманих біонаноконструкцій (біоНЧ).

Іммобілізація ензимів буде здійснюватися у двох основних напрямках: пошук матриць, придатних для іммобілізації ензимів, і вибір методів іммобілізації та стабілізації ензимів (адсорбція, ковалентне зшивання) у складі біосенсорів. Загальний підхід включатиме іммобілізацію ензимів або дріжджових/грибкових клітин на поверхні наноконструкцій для забезпечення збільшення локальних концентрацій ензимів, а також підвищення стабільності ензимів. Ці властивості є критично важливими для виготовлення біосенсорів. Успішне формування біонаноконструкцій буде підтверджено за допомогою сканувальної електронної мікроскопії (SEM), атомно-силової мікроскопії, енергетично-дисперсійного рентгенівського випромінювання (EDX), атомно-емісійної спектроскопії (AES) та електрохімічних методів за використанням потенціостата/гальваностата.

Український партнер отримає високоочищені препарати рекомбінантних та модифікованих ензимів (ГАО; СОХ та різні форми алкогольоксидази). Дослідження з розробки методів синтезу нових наноматеріалів, які можна використовувати для іммобілізації ензимів, проводитиме польський партнер. Дослідження структурних властивостей отриманих наноматеріалів здійснюватиметься спільно на обладнанні польського партнера.

*За цей етап відповідають як українська, так і польська команди.*

**Задача 3. Дослідження функціональних та аналітичних властивостей біоселективних наночастинок, інтегрованих у лабораторні прототипи біосенсорів.**

3.1. Дослідження функціональних та аналітичних властивостей біоселективних наночастинок, інтегрованих у лабораторні прототипи біосенсорів.

3.2. Випробування сконструйованих прототипів біосенсорів на модельних та реальних розчинах, що

містять саркозин, галактозу та первинні спирти.

Український партнер вивчатиме кінетичні особливості окисно-відновних реакцій у ензимних мембранах, кон'югованих з наноматеріалами, у порівнянні з мікроаналогами таких біоселективних елементів. Особливу увагу буде приділено вивченню можливих переваг наноносіїв та генетично модифікованих форм ензимів, зокрема, для підвищення ефективності прямого (безмедіаторного) переносу електронів від молекул ензиму до поверхні електрода, що стане основою для створення нових електрохімічних біосенсорів.

Польський партнер проведе дослідження структурної стабільності отриманих нанобіоматеріалів. Їх фізико-хімічна структура вивчатиметься в динаміці при різних умовах зберігання. Крім того, дослідження фізико-хімічних характеристик біоселективних нанoeлементів буде проводитись на основі лабораторних прототипів біосенсорів, селективних до галактози (на основі ГАО), саркозину (на основі САО) та первинних спиртів (з використанням АО).

За цей етап відповідають як українська, так і польська команди.

### План роботи

№п/п	Стадії	Місяць			
		1 – 5	6 – 11	12 – 17	18 – 24
1.	Культивування клітин дріжджів і грибів; виділення та очищення оксидоредуктаз – перспективних біокатализаторів для конструювання біосенсорів.	x	x		
2.	Синтез, функціоналізація наноносіїв, їх кон'югація з ензимами або клітинами та структурна характеристика отриманих біонаноматеріалів	x	x		
3.	Побудова амперометричних біосенсорів на основі АО та їхня біоаналітична характеристика		x	x	
4.	Побудова амперометричних біосенсорів на основі ГАО та їхня біоаналітична характеристика		x	x	
5.	Побудова амперометричних біосенсорів на основі САО та їхня біоаналітична характеристика			x	x

### Посилання

1) Demkiv Olha, Nogala Wojciech, Stasyuk Nataliya, Klepach Halyna, Danysh Taras, Gonchar Mykhailo (2024) Highly sensitive amperometric sensors based on laccase-mimetic nanozymes for the detection of dopamine. RSC Advances. 14(8): 5472–5478.

2) Stasyuk N., Zakalskiy, A., Nogala, W., Gawinkowski, S., Ratajczyk, T., Bonarowska, M., Demkiv, O., Zakalska, O., Goncha, 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>.

3) 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

4) Demkiv, O., Gayda, G., Stasyuk, N., Moroz, A., Kaušaitė-Minkštienė, A., Gonchar, M., Marina Nisnevitch, M. (2023) Flavocytochrome b<sub>2</sub>-Mediated Electroactive Nanoparticles for Developing Amperometric L-Lactate. Biosensors. 13(6), 587

5) 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>

**Мета проекту:** Заплановані дослідження стосуються кількох суміжних дисциплін (ензимології, нанотехнології, біоелектрохімії та фізичної хімії) і спрямовані на створення нових біоелементів для біосенсорів з використанням нових наноматеріалів. Метою проекту є розробка нових методів отримання біоселективних наноелементів, які складаються з ензимів або клітин і наноосіїв, їх структурно-функціональна характеристика, а також дослідження можливості використання біофункціоналізованих наноструктур для конструювання біосенсорів. Особливу увагу буде приділено вивченню можливих переваг наночастинок порівняно з їхніми мікроаналогами, зокрема, можливості прямого (безмедіаторного) електрохімічного перенесення електронів між ензимами та поверхнею електрода в редокс-системах (на прикладі оксидоредуктаз).

**Взаємовигода та очікувані результати:** Реалізація нинішнього проекту дасть змогу об'єднати ідеї, технічні підходи та експериментальні навички українських та польських наукових колективів. Для реалізації завдань проекту планується проведення низки досліджень об'єднанням зусиль двох наукових колективів: відділу аналітичної біотехнології Інституту клітинної біології НАН України (український партнер, далі – як «УП») та команди польського партнера (далі «Пл-П»: відділ електродних процесів Інституту фізичної хімії Польської академії наук (Варшава, Польща).

УП представлений фахівцями в галузі аналітичної біотехнології, ензимології та біосенсорик, які володіють пріоритетними навичками у конструюванні дріжджових надпродуцентів ензимів і розробці технології отримання високоочищених ензимних препаратів для біоаналітичних цілей. До складу науковців УП входять фахівці із конструювання біоселективних елементів сенсорів. Ними створено високочутливі лабораторні прототиби біосенсорів для селективного визначення етанолу, гліцерину, L-лактату, L-аргініну – сполук, моніторинг яких має велике значення для харчової промисловості, процесів бродіння, екології та клінічної діагностики. Відділ аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України має матеріально-технічне забезпечення для культивування клітин дріжджів і грибів (поживні середовища, стерильні бокси, автоклави, термостати, термостатичні шейкери, дезінтегратори, центрифуги, ліофілізатори; обладнання), необхідні для виділення, очищення ензимів і дослідження їхніх фізико-хімічних характеристик та апаратуру для проведення електрохімічних досліджень (потенціостати «СНІ 1200А» і «PGstat16»).

До складу колективну науковців Пл-П входять фахівці у галузі прикладної електрохімії, колоїдної та нанохімії, які займаються вивченням механізмів рентгенівського і нейтронного розсіювання та використання цих явищ для вивчення структур матеріалів. Пл-П має досвід розробки методів синтезу та функціоналізації наноосіїв різної хімічної природи та іммобілізації на них біологічно активних сполук. Пл-П має дослідницьку, адміністративну та інноваційну компетенцію щодо тематики запланованої проектною пропозиції. У відділі електродних процесів Інституту фізичної хімії Польської академії наук є сучасне високотехнологічне обладнання для конструювання біосенсорів (Потенціостат/Гальваностат Metrohm Autolab PGSTAT30). Для характеристики розміру та морфології НЧ в лабораторіях Інституту доступні прилади для НРС, SLS, DLS, аналізатори розміру частинок, SEM, TEM, ЯМР високої роздільної здатності, флуоресцентний спектрометр Perkin Elmer LS 50B, прилад для динамічного розсіювання світла.

У результаті наукової співпраці польські колеги отримають доступ до унікальних комерційно недоступних рекомбінантних ензимів, отриманих українським партнером із генетично модифікованих мікроорганізмів. У свою чергу, українська команда скористається досягненнями польського партнера в галузі отримання нових наноматеріалів і отримає доступ до унікального обладнання. Проект також сприятиме професійному розвитку молодих науковців обох країн завдяки публікаціям у престижних міжнародних журналах. Результати дослідження будуть використані для підготовки магістерської роботи та кандидатської дисертації молодих науковців, які входять до складу колективу. Співпраця між лабораторіями України та Польщі відбуватиметься у формі спільних досліджень та презентації результатів у формі спільних публікацій та/або патентування.

#### **Участь молодих дослідників у проекті:**

**З української сторони** в реалізації проекту візьмуть участь 5 науковців: 1 доктор біологічних наук, член-кореспондент НАН України (проф. Гончар М.В.), 1 молодий доктор біологічних наук (Стасюк Н.С.), 2 наукові співробітники (Демків О.М. та Закальський А.С.) та 1 молодий вчений – Наум Ю.М. (студентка 5 курсу біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка).

**З польської сторони** до проекту буде залучено 4 особи: 3 науковці та 1 молодий вчений (аспірант).

В результаті обміну вчені з двох команд створять нові лабораторні прототиби біонаносенсорів з покращеними аналітичними параметрами, які потенційно є предметом патентування.

Очікувані результати міжнародної співпраці в рамках Проєкту:

- інтеграція науковців двох європейських країн зі спільними внутрішньо- та міждисциплінарними дослідженнями;
- методологічне збагачення вчених двох сторін;
- підготовка спільних проєктів у рамках європейських наукових і науково-технічних програм;
- публікації в престижних наукових журналах;
- значний освітній вплив за рахунок участі молодих вчених/аспірантів і студентів у планових дослідженнях;
- кар'єрний ріст молодих науковців обох країн за результатами публікацій у престижних міжнародних журналах.

*Деталі етичної політики*

- Будуть опубліковані лише відтворювані перевірені результати
- Усі рукописи будуть схвалені всіма співавторами
- Усі співавтори будуть залучені до процесу прийняття рішення щодо вибору відповідного журналу
- Першим автором буде людина, яка проведе більшість експериментів

В результаті реалізації проєкту будуть створені нові лабораторні прототипи амперометричних біосенсорів з покращеними аналітичними параметрами, які потенційно заслуговують патентування.

**Очікувані результати міжнародної співпраці в рамках Проєкту:**

- інтеграція науковців двох європейських країн зі спільними внутрішньо- та міждисциплінарними дослідженнями;
- методологічне збагачення науковців двох сторін;
- значний освітній вплив за рахунок участі молодих вчених/аспірантів і студентів у планових дослідженнях;
- Результати будуть представлені у статтях у рейтингових журналах та на міжнародних конференціях, симпозіумах і семінарах. Реалізація наукових завдань проєкту забезпечить чудовий простір для передачі знань через тісне партнерство між двома країнами та забезпечить обмін знаннями, що принесе багатообіцяючу користь як партнерам, так і нанонауці загалом. Отримані результати сприятимуть майбутнім можливостям співпраці та партнерства для Інститутів, а також стануть основою для подання нових спільних проєктів.

**План наукових обмінів на кожен рік:** (на всі роки тривалості проєкту)

	1-й рік	2-й рік
<b>Візити українських науковців до Польщі</b>		
• Загальна кількість осіб	5	5
• Загальна кількість поїздок	5	5
• Загальна тривалість подорожей (у днях)	50	50
<b>Візити польських науковців до України</b>		
• Загальна кількість осіб	4	4
• Загальна кількість поїздок	4	4
• Загальна тривалість подорожей (у днях)	40	40

**ПІДПИС**


З боку НАНУ:
Керівник проєкту: проф., д.б.н. Гончар М.В.
Дата: 30.09.2024

ПІДПИС

З боку НАНУ:

Керівник проєкту: зав. відділом аналітичної біотехнології Інституту біології клітини НАН України, чл.-кор. НАН України, проф., д.б.н. Михайло ГОНЧАР

Дата: 30.09.2024



## APPLICATION FOR AN UKRAINIAN – POLISH JOINT RESEARCH PROJECT

### UNDER THE AGREEMENT ON SCIENTIFIC COOPERATION BETWEEN THE POLISH ACADEMY OF SCIENCES AND THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF UKRAINE

**Project title:** Physicochemical characterization of synthetic catalytic nanomaterials suitable for the construction of amperometric biosensors.

#### Polish side:

#### Ukrainian side:

<b>Institute:</b> Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences	<b>Institute:</b> Institute of Cell biology, National Academy of Science of Ukraine
<b>Postal code and address:</b> 01-224, Kasprzaka Str. 44/52, 01-224 Warsaw, Poland	<b>Postal code and address:</b> 79005, Drahomanov Str., 14/16, 79050, Lviv, Ukraine
<b>Project leader:</b> Wojciech Nogala, Dr., inż. ☎ +48 22 343 3375	<b>Project leader:</b> Mykhailo Gonchar, Dr.Sc., Prof. ☎ +38032-261-2144
<b>Fax:</b> 22 343 3333; 22 632 5276	<b>Fax:</b> 38 044 266 23 79
<b>E-mail:</b> wnogala@ichf.edu.pl	<b>E-mail:</b> mykhailo1952@gmail.com
<b>The project participants:</b> Gylwester Gawinkowski, Dr., Group Leader, Molecular Nanophotonics, Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences. Marcin Hołdyński, Dr. inż., Laboratory of Scanning Electron Microscopy, Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences. Vaishali Shrivastav, PhD student, Institute of Physical Chemistry of the Polish Academy of Sciences	<b>The project participants:</b> Nataliya Stasyuk, D.Sc., Research Associate, Deputy Director for Science, Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine. Andriy Zakalskiy, PhD, Associate Professor, Department of Microbiology; Research Officer, Department of Analytical Biotechnology, Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine. Olha Demkiv, PhD, Research Officer, Department of Analytical Biotechnology, Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine. Yuliya Naum, Engineer, Department of Analytical Biotechnology, Institute of Cell Biology, National Academy of Sciences of Ukraine.

**Start date:** 2025

**Term:** 2025-2027

#### ANNOTATION:

**Scientific field:** Biotechnology, Nanotechnology, Bioelectrochemistry



**Description of the project:** The planned research “Physicochemical characterization of synthetic catalytic nanomaterials suitable for the construction of amperometric biosensors” concerns several adjacent disciplines (enzymology, physical chemistry, nanotechnology and electrochemistry) and is aimed at creation of new bioelements for biosensors using nanomaterials.

Project’s objective is a development of new methods of obtaining bioselective nanoelements, which consist of enzymes/cells and nanocarriers, their structural and functional characterization as well as study of the possibility to use biofunctionalized nanostructures for construction of biosensors. As shown in our recent publications [1-4], the use of novel conducting nanomaterials results in improving analytical characteristics of biosensors.

Excellence and originality of the project are based on the idea to use commercially unavailable red-ox enzymes. The goal enzymes, including recombinant, will be purified from microbial over-producers’ cells and immobilized on conductive nanomaterials (or co-immobilized with them on electrode’ surface), and will be used for amperometric biosensors’ construction. The objective of the proposed scientific investigation is the combination of research with practice by the usage cutting-edge science and technology in an interdisciplinary research field.

Several scientific and technical objectives of the project are defined as following:

1. To obtain new metallic nanoparticles (NPs) by chemical synthesis.
2. To obtain NPs with catalytic properties by conjugation with redox enzymes (bioNPs).
3. To characterize the properties of obtained bioNPs with the usage of high-tech physical methods.
4. To develop and characterize the novel bioNPs-based electrodes for amperometric biosensors.

The main idea of the research is creation of the new biocatalysts, based on the traditional and new nano-biomaterials, to be used for construction of amperometric biosensors (ABS). Various electro-active nanomaterials, including nanoparticles (NPs) of noble and transitional metals, will be exploited as carriers for enzymes/cells immobilization. Recently, NPs are of a huge scientific and practical importance for both fundamental research and potential applications in medicine and high-tech industry. In current project, metallic NPs, obtained by sol-gel method, will be modified by introduction of additional groups (-NH<sub>2</sub>, -COOH), followed by biofunctionalization with enzyme/cell using bifunctional reagent.

We plan to develop novel highly selective, sensitive and stable ABS with the usage of the next oxidoreductases (OR): galactose oxidase (GAO), alcohol oxidase (AO) and sarcosine oxidase (SOX). For this purpose, highly purified OR and genetically modified yeast cells, over-producers of the target OR, will be immobilized on the surface of electrodes by incorporation into the polymeric matrixes. The optimized matrix, containing NPs, will allow increase a local OR concentration, and enhance a stability of the OR that is critically important for application of such biocatalysts in construction of ABS. The motivation to use cell-based catalysts is mostly related with non-availability of some OR on the commercial market, and because they a very economical alternative to the purified OR.

In the planned research, GAO, AO (or yeast cells as the producers) and SOX, conjugated with NPs (bioNPs), will be characterized in the aspect of their structural and functional properties: catalytic parameters, selectivity of responses to the relevant substrates, functional and storage stability. Special attention will be paid to study of possible advantages of bioNPs compared with their micro-analogues, in particular, possibility of direct (mediator-less) electrochemical communication between OR and electrode surface in red-ox systems, namely, biosensors. We demonstrate recently that conjugation of peroxidase with NPs of noble metals resulted in significant amplification of electrochemical signal, a higher stability of mediator-less ABS, as well as to broadening the linearity range of hydrogen peroxide detection and a higher sensitivity of the bioelectrode [5]. According to our preliminary results, some compositions of two-components-hybrid NPs would be promising chemo-sensors on hydrogen peroxide.

Optimized bioselective membranes (containing OR, immobilized on the most effective NPs) will be tested as sensor elements of laboratory prototypes of analyzers for assay of practically important analytes – galactose, primary alcohols, sarcosine, important metabolites in clinical diagnostics and key components in food products.

The use of nanomaterials as carriers of enzymes/cells will enable obtaining qualitatively new characteristics of biocatalysts, and especially for enzymes – enhanced ability for direct electron transfer to transducer’s surface. Combination of novel bio- and nanotechnologies is expected to give possibility to create new materials and to develop novel mediator-less biosensors.

**The main expected results are the following:**

- 1) The new approaches for synthesis and functionalization of NPs will be proposed. The number of mono-

and core-shell hybrid NPs, containing 2-3 different noble or transition metals will be obtained and characterized by their physico-chemical properties as well as by ability for sensing hydrogen peroxide.

2) The highly-purified active oxido-reductases alcohol oxidase (AO) and galactose oxidase (GAO) will be isolated from the correspondent over-producers of the yeast (*Ogataea polymorpha*) and fungal (*Fusarium oxysporum*) strains.

3) The number of new biofunctionalized NPs (bioNPs) will be obtained by immobilization of enzymes (AO, SOX and GAO) or corresponding microbial cells on the surfaces of different functionalized NPs. The obtained bioNPs will be characterized in aspect of their structure, physico-chemical and catalytic properties.

4) The most effective (catalytically active and stable) bioNPs based on AO, SOX and GAO will be studied as bio-recognizing elements of amperometric biosensors, sensitive to the analytes (primary alcohols, sarcosine and galactose, respectively), will be constructed and tested on real samples of food products.

Our findings might be eventually important for fundamental and applied natural sciences. The expected outcome of the project goes beyond the existing state of the art and the project is expected to generate innovative results. The joint papers (or patents) and abstracts of international conferences resuming the obtained results will be prepared for publication. Taking into account the listed advantages of bioNPs, we can conclude that scientific, environmental, social and economic impact of the project will be significant.

*The research program consists of the following tasks:*

Task 1. Cultivation of the yeast and fungal cells; isolation and purification of oxidoreductases – promising biocatalysts for the construction of biosensors.

1.1. Yeast or fungal cells, over-producers of the target enzymes, will be cultivated under optimal conditions.

1.2. Enzymes alcohol oxidase (AO) and galactose oxidase (GAO) will be isolated from the yeast or fungal cells, purified with chromatographic methods and characterized. These enzymes and the cells as well as commercial sarcosine oxidase (SAO) will be used for biosensors construction.

*Ukrainian team is responsible for this stage.*

Task 2. Synthesis, functionalization of nano-carriers of different origin, their conjugation with enzymes and structural characterization of obtained nanobiomaterials.

2.1. Design, chemical synthesis and characterization of metallic NPs.

2.2. Testing of the influence of the synthesized NPs on enzymatic activity of the target enzymes.

2.3 Development of appropriate techniques for the red-ox enzymes' immobilization on nanocomposites.

2.4 Immobilization of the purified enzymes using the selected optimal NPs as a matrix.

2.5. Physical and physicochemical characterization of obtained enzyme-bounded NPs (bionanocomposites, bioNPs).

Enzymes' immobilization will be carried out in two main directions: a search of matrixes suitable for immobilization of enzymes and a choice of methods for immobilization and stabilization of the enzymes (adsorption, covalent cross-linking) in biosensors. The general approach will include the immobilization of enzymes or yeast/fungal cells on the surface of nanocomposites to provide an increase in enzymes' local concentrations and enhancement of the enzyme's stability. These properties are critically important in biosensors fabrication. The successful formation of bionanocomposites will be confirmed by scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy, Energy dispersive X-ray (EDX), atomic emission spectroscopy (AES) and by electrochemical methods with potentiostat/galvanostat.

Ukrainian partner will obtain highly purified preparations of recombinant and modified enzymes (GAO– without modifications and tagged form with hexahistidine cluster on N-terminal end; sarcosine oxidase and various forms of alcohol oxidase). Research on development of methods of synthesis of new nanomaterials, which can be used for enzymes immobilization, will be conducted by the Polish partner. Study of structural properties of obtained nanomaterials will be jointly realized using facilities of Polish partner.

*Both Ukrainian and Polish teams are responsible for this stage.*

Task 3. Study of functional and analytical properties of bioselective nanoelements integrated into laboratory prototypes of biosensors.

3.1 Study of functional and analytical properties of bioselective nanoelements integrated into laboratory prototypes of biosensors.

### 3.2 Testing the constructed biosensors prototypes on sarcosine, galactose and primary alcohols.

Ukrainian partner will study kinetic peculiarities of redox-reactions in enzymatic membranes, conjugated with nanomaterials, compared with micro-analogues of such bioselective elements. Special attention will be paid to study of possible advantages of nano-carriers and genetically modified forms of enzymes, in particular, for increasing efficiency of direct (mediatorless) electron transfer from enzyme molecules to electrode surface, which would be as a basis for creation of new (third) generation of electrochemical biosensors.

Polish partner will carry out research on structural stability of obtained nanobiomaterials. Their physical and chemical structure will be studied in dynamics at different storage conditions. Moreover, study of physicochemical characteristics of bioselective nanoelements will be carried out using as a model the laboratory prototypes of biosensors selective to galactose (based on GAO), sarcosine (based on SAO) and primary alcohols (with the use of AO).

*Both Ukrainian and Polish teams are responsible for this stage.*

#### Graphical presentation of the work plan

No	Stage	Month			
		1 – 5	6 – 11	12 – 17	18 – 24
1.	Preparation of the yeast/fungal cells and enzymes	x	x		
2.	Synthesis, functionalization of nano-carriers, their conjugation with enzymes or cells and structural characterization	x	x		
3.	Construction of amperometric biosensors based on AO and their bioanalytical characterization		x	x	
4.	Construction of amperometric biosensors based on GAO and their bioanalytical characterization		x	x	
5.	Construction of amperometric biosensors based on SAO and their bioanalytical characterization			x	x

#### References

- 1) Demkiv Olha, Nogala Wojciech, Stasyuk Nataliya, Klepach Halyna, Danysh Taras, Gonchar Mykhailo (2024) Highly sensitive amperometric sensors based on laccase-mimetic nanozymes for the detection of dopamine. *RSC Advances*. 14(8): 5472–5478.
- 2) Stasyuk N., Zakalskiy, A., Nogala, W., Gawinkowski, S., Ratajczyk, T., Bonarowska, M., Demkiv, O., Zakalska, O., Goncha, 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>.
- 3) 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
- 4) Demkiv, O., Gayda, G., Stasyuk, N., Moroz, A., Kaušaitė-Minkštienė, A., Gonchar, M., Marina Nisnevitch, M. (2023) Flavocytochrome b<sub>2</sub>-Mediated Electroactive Nanoparticles for Developing Amperometric L-Lactate. *Biosensors*. 13(6), 587
- 5) 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>

**Project objectives:** The planned research concerns several adjacent disciplines (enzymology, nanotechnology, electrochemistry and physical chemistry) and is aimed at creation of new bioelements for

biosensors using nanomaterials. Project's objective is a development of new methods of obtaining bioselective nanoelements, which consist of enzymes/cells and nanocarriers, their structural and functional characterization as well as study of the possibility to use biofunctionalized nanostructures for construction of biosensors. Special attention will be paid to study of possible advantages of nanoparticles compared with their micro-analogues, in particular, possibility of direct (mediatorless) electrochemical communication between enzymes and electrode surface in redox systems (on the example of oxidoreductases).

**Expected/Intended results and benefits:** Realization of the current project will make it possible to join ideas, technical approaches and experimental skills of Ukrainian and Polish research teams. For the realization of the Project's tasks, it is planned to carry out a number of studies with combined efforts of two scientific teams: team of the Department of Analytical Biotechnology of the Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine (Ukrainian partner, hereinafter referred to as "UP") and team of Polish partner (hereinafter referred to as "PL-P": Department of Electrode Processes, Institute of Physical Chemistry, Polish Academy of Sciences (Warsaw, Poland).

UP is represented by specialists in the field of analytical biotechnology, enzymology and biosensorics. UP possesses priority results in construction of yeast over-producers of enzymes and development of technology of obtaining highly purified enzymatic preparations for bioanalytical purposes. UP is composed of specialists in construction of bioselective elements of sensors. They have created highly sensitive laboratory prototypes of laboratory biosensors for selective determination of ethanol, glycerol, L-lactate, L-arginine – compounds, monitoring of which has a great importance for food industry, fermentation processes, ecology and clinical diagnostics. Moreover, UP has developed enzymatic, including biosensoric, approaches to the analysis of xenobiotics and at the same time toxic metabolite – formaldehyde; conducts work on development of biosensoric approaches to the analysis of methylamine in fish products and D-lactate in yoghurts and blood. The Department of Analytical Biotechnology, Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine has the material and hardware support for the cultivation of yeast and fungal cells (culture media, sterile boxes, autoclaves, thermostats, thermostatic shakers, disintegrators, centrifuges, lyophilizers; the equipment for isolation, purification of enzymes and study of their physicochemical characteristics and apparatus for conducting electrochemical studies (potentiostats "CHI 1200A" and "PGstat16").

PL-P is composed of specialists in the field of applied electrochemistry, colloid and nano-chemistry, study of mechanisms of photic, X-ray and neutron scattering and use of these phenomena for studying of materials structures. PL-P has experience in the development of methods of synthesis and functionalization of nano-carriers of various chemical nature and immobilization on their service of biologically active compounds. PL partner has research, administrative and innovation management competence in thematic of the planned project proposal. In the Department of Electrode Processes, IChF PAS there is modern high-tech equipment for the design and operation of biofuel cells (Potentiostat/Galvanostat Metrohm Autolab PGSTAT30). To characterize the size and morphology of NPs: HPC, SLS, DLS, particle size analyzers, high resolution SEM, TEM, NMR, Perkin Elmer LS 50B Fluorescence spectrometer, dynamic light scattering instrument is available in the Institute labs.

As a result of scientific cooperation, Polish colleagues will have access to the unique, commercially unavailable, recombinant enzymes obtained by Ukrainian Partner from genetically modified microorganisms. In its turn, the Ukrainian team will take advantage of the Polish Partner's achievements in the field of obtaining novel nanomaterials and will get access to the unique equipment. Project will also enhance professional development of young scientists from both countries as a result of publication in prestigious international journals. Results of research will be used for preparation of PhD thesis and doctoral thesis. Cooperation between the UA and the PL laboratories will take the form of joint research activities and evaluation of the results that will be displayed in joint publications and/or patenting.

**Participation of junior researchers in the project:**

5 scientists from the UA will take part in the implementation of the project: 1 Doctor of Biological Sciences, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Ukraine (Prof. Gonchar M.V.), 1 young Doctor of Biological Sciences (N.Ye. Stasyuk), 2 researchers (Demkiv O.M. and Zakalsky Andriy Yevstakhovich) and 1 young scientist - Naum Yu.M. (student of the 5th year of study of the Faculty of Biology of Ivan Franko National University of Lviv). From the PL-P 4 people will be involved in the project: 3 scientists and 1 young scientist (postgraduate student).

Two scientists of Ukrainian Partner (Dr. hub. Nataliya Stasyuk and Dr. Olha Demkiv) carried their scientific work in the Institute of Physical Chemistry Polish Academy of Science in the frame of the individual FEBS and IIE-SRF fellowships during 2022 – 2024 years.

The obtained results were combined in the the set of scientific works titled "Electrodes based on enzymes, recombinant cells and nanozymes for the construction of biosensors" and was submitted for the competition for joint awards of the National Academy of Sciences of Ukraine and the Polish Academy of Sciences for the best results achieved by scientists of both Academies during joint research. The work on the creation of biosensor devices, presented in the set of scientific publications "Electrodes based on enzymes, recombinant cells and nanozymes for the construction of biosensors", was also carried out in accordance with the terms of Memorandum of Understanding on scientific and technical cooperation, signed between the Institute of Physical Chemistry of the Polish Academy of Sciences (Warsaw) and the Institute of Cell Biology of the National Academy of Sciences of Ukraine (Lviv).

**Plan of the scientific exchanges** (for each year of the project duration):

	1 <sup>st</sup> year	2 <sup>nd</sup> year
<b>Ukrainian scientist to Poland</b>		
Total number of persons	5	5
Total number of travels	5	5
Total duration of travels (in days)	50	50
<b>Polish scientist to Ukraine</b>		
Total number of persons	4	4
Total number of travels	4	4
Total duration of travels (in days)	40	40

**SIGNATURES**

<b>Polish side:</b>	<b>Ukrainian side:</b>
Project leader: Dr., inz. Wojciech Nogala	Project leader: Prof., Dr.hub. Mykhailo Gonchar
Date:	Date: 30.09.2024

SIGNATURES

Polish side:	Ukrainian side:
Project leader: Dr., inż. Wojciech Nogala <i>Wojciech Nogala</i>	Project leader: Dr.Sc., Prof. Mykhailo Gonchar <i>[Signature]</i>
Date: <i>08.10.2024</i>	Date: 30.09.2024

**PART VI: SIGNATURES**

This project application must be signed and dated by both Project Leaders and Directors of both cooperating institutions

I confirm that the above personal data were obtained as a result of the voluntary consent of data subjects and in accordance with art. 6 par. 1 of the Regulation (EU) 2016/679 of the European Parliament and of the Council of 27 April 2016 on the protection of natural persons with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data, and repealing Directive 95/46/EC (General Data Protection Regulation), in order to implement the PAN's projects in the field of international cooperation.

At once, I declare that in relation to the above people, the information obligation has been fulfilled under Article 13 of the regulation, which indicated, among others that the personal data administrator is the reporting institution.

Dr., inz. Wojciech Nogala

*Wojciech Nogala*

08.10.2024

Polish Project Leader

Date

Dr. hab., Prof. Adam Kubas

*Kubas*

INSTYTUT CHEMII FIZYCZNEJ  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK  
ul. Kasprzaka 44/52  
01-224 Warszawa  
NIP 525-000-87-55  
REGON 000326049

09.10.2024

Date

Director of Polish cooperating institution

Dr.Sc., Prof. Mykhailo Gonchar



30.09.2024

Foreign Project Leader

Date

Dr.Sc., Prof. Andriy Sibirny

*Sibirny*

30.09.2024

Director of the foreign cooperating institution

Date