

УДК.577.15.543.555

КОНДУКТОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР НА ОСНОВІ ТРИФЕРМЕНТНОЇ СИСТЕМИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ САХАРОЗИ

О. О. Солдаткін¹,
В. М. Пешкова^{1,2},
С. В. Дзядевич¹,
Г. В. Єльська¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка

E-mail: alex_sold@yahoo.com

Охарактеризовано створений біосенсор для визначення сахарози, в якому складна триферментна мембрана виконує роль чутливого елемента, іммобілізованого на кондуктометричній перетворювач. Час визначення концентрації сахарози в розчині — 1–2 хв. Динамічний діапазон визначення може змінюватись залежно від буферної ємності. Так, у 5 мМ фосфатному буферному розчині він становить 2 мкМ — 5 мМ сахарози. Досліджено залежність роботи біосенсора від рН та іонної сили розчину. Наведено дані щодо селективності сенсора та зберігання його в різних умовах. Розроблений кондуктометричний біосенсор відзначається високою операційною стабільністю та відтворюваністю сигналу і придатний для використання в реальних умовах.

Ключові слова: сахароза, глюкоза, кондуктометричний біосенсор, інвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза.

Моніторинг біотехнологічних процесів культивування та ферментації є необхідним для більш глибокого розуміння, оптимізації та контролю за їх перебігом [1]. Наприклад, у деяких процесах ферментації як живильне середовище часто використовують мелясу із цукрового буряка. Вона є також природним джерелом для виробництва різних продуктів [2]. Сахароза, що є основною компонентою меляси, використовується як рідкий цукор у харчовій промисловості, входить до складу багатьох харчових продуктів та напоїв. Деякі спеціальні цукри також застосовують у фармацевтичній та косметичній галузях [3, 4]. Інформація про наявність і концентрацію сахарози в деяких напоях та продуктах харчування є важливим показником їхньої якості. Сучасні стандартні методи визначення сахарози потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного й дорогого обладнання, що, зокрема, необхідно для рідинної хроматографії, хімічних та оптичних методів [5, 6]. Інші методи, що ґрунтуються на визначенні густини чи рефракторного індексу, є простими і швидкими, однак менш точними. До того ж вони досить чутливі до присутності в розчинах різних

інтерферуючих компонентів [7]. Сьогодні надзвичайно актуальним є питання створення більш зручного, точного, селективного, швидкого та дешевого методу визначення вмісту цукру в різноманітних алкогольних і безалкогольних напоях та продуктах харчування.

Розроблення та створення ферментних біосенсорів для визначення сахарози може якнайкраще усунути перераховані вище недоліки і задовольнити всім вищезазначеним умовам. На цей час у науковій літературі є відомості щодо розроблення низки варіантів сахарозних біосенсорів [7–12]. Перший такий біосенсор створювали, використовуючи іммобілізовані на поверхню кисневого електрода ферменти інвертазу, мутаротазу та глюкозооксидазу (ГОД) [11]. Однак ця система виявилась дуже чутливою до рівня кисню в реакторі і мала низьку селективність. В інших роботах для перетворення α -глюкози на β -форму замість мутаротазу використовували іони фосфату [7, 12]. У роботі [12] автори застосовували коіммобілізовані з ГОД клітини дріжджів як джерело інвертази. Детектування в цьому разі також базувалось на поглинанні кисню. Але всі ці біосенсори були амперометричними і поряд із

перевагами мали низку суттєвих недоліків. Передусім це вимірювання з використанням високого потенціалу, що призводить до похибок через присутність у розчинах інших електроокисних компонентів, таких, наприклад, як аскорбінова кислота. Силу інтерферуючого струму можна зменшити, використовуючи додаткові мембрани [13] чи полімерні плівки [14], однак це ускладнює процедуру виготовлення біосенсорів і, відповідно, збільшує загальну вартість аналізу.

Досить перспективним, на наш погляд, є кондуктометричний метод вимірювання вмісту сахарози, який досі ще не застосовувався. Кондуктометричні методи аналізу є достатньо прості, зручні й точні і дозволяють вирішити ряд важливих науково-дослідних та виробничих завдань [15]. До того ж кондуктометричні датчики мають суттєві переваги порівняно з іншими електрохімічними перетворювачами [16], а саме: нема потреби в технологічно складному електроді порівняння; можливість використання під час роботи змінної напруги малої амплітуди, що дозволяє уникнути фарадеївських процесів на електродах; відсутність світлочутливості, на відміну від іонселективних польових транзисторів; здатність до мініатюризації та до великого ступеня інтеграції в разі використання недорогої тонкоплівкової стандартної технології; дешевизна за умов масового виробництва. Як відомо, типовим недоліком кондуктометричного методу вимірювання є залежність сигналу від загальної провідності розчинів, але у випадку ферментних кондуктометричних біосенсорів цього можна уникнути, застосовуючи диференційний режим вимірювань [15].

Саме наявність зазначених переваг робить перспективним створення кондуктометричного сахарозного біосенсора з використанням каскаду реакцій триферментної системи.



Матеріали і методи

У дослідженнях використовували препарати ліофілізованих ферментів: ГОД із *Penicillium vitale* (ЕС 1.1.3.4.) з активністю 130 U/мг фірми «Діагностикум»; інвертазу (β -фруктофуранозидазу, ЕС 3.2.1.26) із пекарських дріжджів з активністю 355 U/мг фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина); мутаротазу (ЕС 5.1.3.3.) з активністю 100 U/мг фірми Biozyme Laboratories Ltd (Великобританія). Бичачий сироватковий альбумін (БСА, фракція V) та 50% -й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) було отримано від фірми Sigma-Aldrich Chemie (Німеччина). Як субстрат і речовину для аналізів використовували цукрозу. Робочим буфером був калійфосфатний розчин ($\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-NaOH}$), рН 7,2, фірми Merck (Німеччина). Інші неорганічні сполуки, що їх застосовували в роботі, були вітчизняного виробництва зі ступенем чистоти «х.ч.» та «ч.д.а.». Використовували також вимірювальну установку та перетворювачі, детально описані в попередніх роботах [16, 17].

Виготовлення біоселективних мембран.

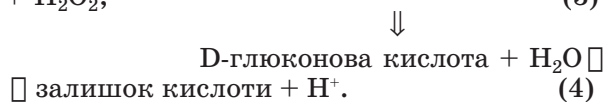
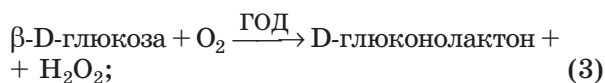
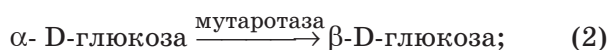
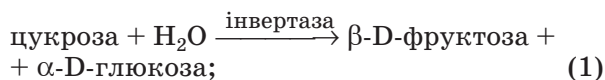
Для виготовлення робочої мембрани готували розчин зі вмістом ферментів: інвертаза — 4%, мутаротазу — 3%, глюкозооксидаза — 3% (далі — триферментний розчин) у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, з 10% -м гліцерол. Суміш для приготування референтної мембрани готували так само, але замість ферментів брали тільки БСА. Перед нанесенням на поверхню перетворювача розчини для референтної і робочої мембран змішували з 2% -м водним розчином глутарового альдегіду у співвідношенні 1:1 і наносили суміші на робочі поверхні гребінчастих електродів. Обидві мембрани мали однаковий вміст білка. Потім сенсори висушували протягом 20 хв на повітрі при кімнатній температурі. Перед початком роботи для вимивання надлишку ГА сенсор занурювали у буферний розчин, в якому і проводили подальші досліді.

Методика вимірювання. Вимірювання проводили у 5мМ фосфатному буфері та універсальному буфері з різним рН при кімнатній температурі у відкритій комірці за інтенсивного перемішування. Концентрацію субстратів у комірці задавали, додаючи до робочого буфера порціями стандартні концентровані вихідні розчини субстрату. Дослідження здійснювали щонайменше у трьох серіях.

Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливанням температури, рН середовища, електричними наводками, пригнічували, застосовуючи диференційний режим вимірювань.

Результати та обговорення

В основі роботи кондуктометричного біосенсора для визначення вмісту сахарози лежить каскад ферментативних реакцій:



Інвертаза, мугаротаза і глюкозооксидаза поступово розщеплюють цукрозу до пероксиду водню та D-глюконолактону. Глюконолактон, у свою чергу, спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, яка дисоціює на залишок кислоти і протон. За таких умов змінюється провідність розчину, яку можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача [18].

Зміна провідності може залежати як від самої ферментативної реакції, так і від характеристик розчину, в якому ця реакція відбувається. Тому насамперед було досліджено вплив параметрів розчину на величину відгуку створеного нами сенсора.

Важливою характеристикою буфера, яка може негативно впливати на вимірювання за допомогою кондуктометричного біосенсо-

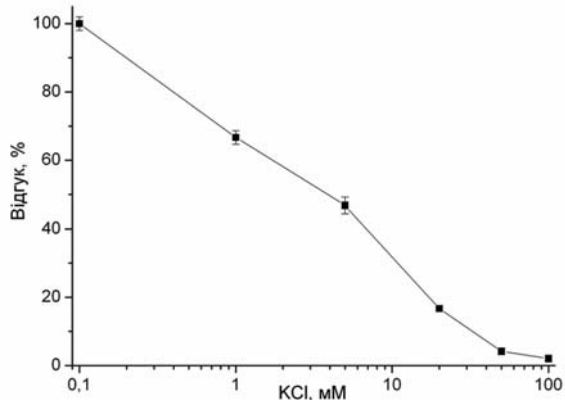


Рис. 1. Залежність величини відгуку біосенсора від іонної сили розчину. Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,5

ра, є іонна сила. Щоб дослідити цей вплив, було проведено вимірювання величини сигналу на одну концентрацію субстрату (1 мМ сахарози) із додаванням у розчин KCl у різних концентраціях (від 1 мМ до 100 мМ) (рис. 1). Із побудованого на основі одержаних даних графіка видно, що зі збільшенням іонної сили відгук на концентрацію субстрату зменшується за експонентою: спочатку спостерігається значне зменшення величини відгуків біосенсора, при концентрації 50 мМ KCl величина сигналу падає до 5%, а за подальшого додавання KCl сигнал залишається стабільним. Одна з головних причин такої залежності пов'язана зі зростанням фонові провідності розчину. Тому під час проведення вимірювань за допомогою кондуктометричного біосенсора дуже важливим є контроль іонної сили аналізованих зразків.

На рис.2 подано калібрувальні графіки залежності величини відгуку біосенсора від концентрації сахарози в буферному розчині для різних буферних ємностей. Видно, що зі зміною концентрації буферного розчину певною мірою змінюються величини відгуків біосенсора та лінійний діапазон визначення. Чутливість кондуктометричного біосенсора щодо наявності цукрози виявилася найбільшою у 2,5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2. Але в даному разі лінійний діапазон роботи біосенсора був зсунутий у бік низьких концентрацій. Біосенсор визначав лінійну залежність величини відгуку від концентрації сахарози в діапазоні 0,001–2,5 мМ. Під час роботи біосенсора в 5 мМ фосфатному буфері лінійний діапазон визначення сахарози дещо ширший — 0,002–5 мМ (рис. 2). У разі роботи біосенсора в 10 та 20 мМ фос-

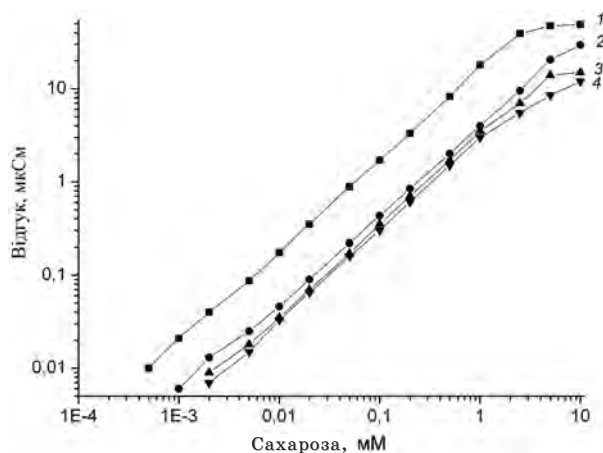


Рис. 2. Залежність відгуку сенсора від концентрації сахарози при різних концентраціях буфера.

Вимірювання проводили у 2,5 мМ (1), 5 мМ (2), 10 мМ (3) і 20 мМ (4) фосфатних буферах, рН 7,2

фатному буфері чутливість його щодо сахарози знижувалась. Отже, використовуючи для проведення аналізу буферні розчини різної концентрації, можна одержувати різні діапазони роботи створеного нами сенсора з різною чутливістю, що дає змогу адаптувати його до конкретних прикладних завдань.

Як відомо, кожен фермент має певний рН-оптимум для своєї роботи. Деякі ферменти після їх іммобілізації здатні змінювати свій рН-оптимум, зсуваючи його або в лужну, або в кислу зону. В нашому випадку маємо суміш трьох іммобілізованих на поверхню сенсора ферментів з різними рН-оптимумами. Тому наступним нашим завданням було знайти оптимальний рН буфера для роботи всіх ферментів та, відповідно, кондуктометричного біосенсора для визначення вмісту сахарози. Відомо, що однокомпонентний буфер змінює буферну ємність у разі зміни його рН. Щоб уникнути впливу буферної ємності на величину відгуку, було досліджено залежність відгуку сенсора від рН універсального багатокомпонентного буфера, який характеризується однаковою буферною ємністю в широкому діапазоні значень рН. Він складається із суміші різних буферних розчинів (фосфорна, оцтова, борна кислоти з концентрацією 0,04 М) у діапазоні рН від 3,5 до 8,5 [18]. Графік залежності величини сигналу на внесення 1 мМ сахарози від рН мав дзвоникоподібну форму з максимумом при рН 6 (рис. 3).

Однією з найважливіших характеристик біосенсорів є операційна стабільність та відтворюваність сигналу. Протягом кожного з чотирьох робочих днів з інтервалом 30 хв одержували відгуки біосенсора на одну й ту

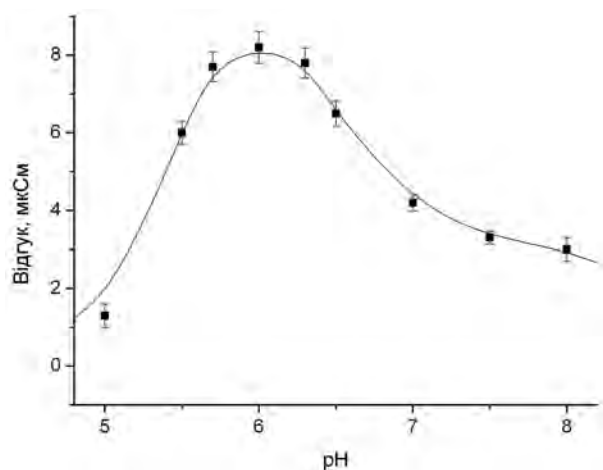


Рис. 3. Залежність відгуку біосенсора від рН розчину.

Вимірювання проводили в універсальному буфері, концентрація сахарози становила 1 мМ

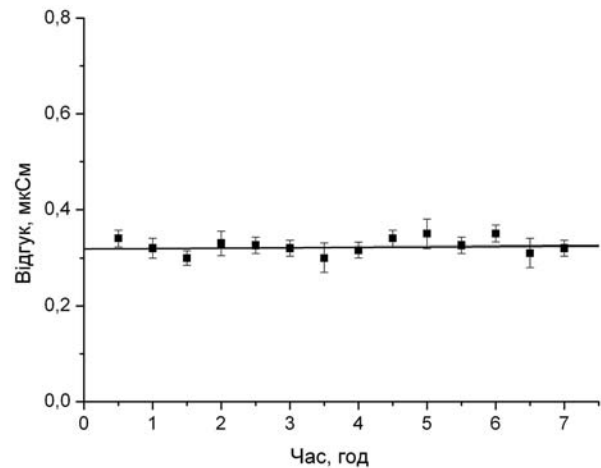


Рис. 4. Відтворюваність сигналу протягом одного робочого дня. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2

саму концентрацію сахарози — 0,5 мМ, при цьому сенсор весь час між вимірюваннями залишався в буфері під постійним перемішуванням. У той час, коли біосенсори не використовувалися в аналізах, їх зберігали в сухому стані при кімнатній температурі. Вибрана для досліджень концентрація сахарози знаходилась на лінійному відрізку калібрувальної кривої біосенсора. Як видно з рис. 4, сенсор упродовж усіх днів дослідження характеризувався високою відтворюваністю, а протягом тижня — високою операційною стабільністю (рис. 5).

З метою можливої подальшої комерціалізації розробленого біосенсора було проведено низку дослідів з вивчення стабільності біосенсорів за певних умов їх зберігання (рис. 6). Біосенсори зберігали в 5 мМ фосфатному

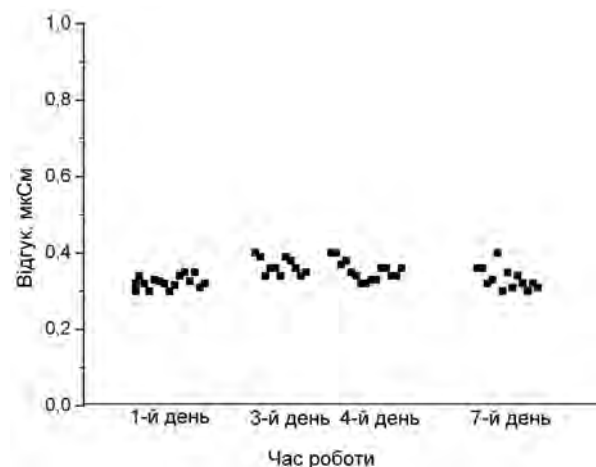


Рис. 5. Операційна стабільність кондуктометричного біосенсора для визначення сахарози. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буфері, рН 7,2

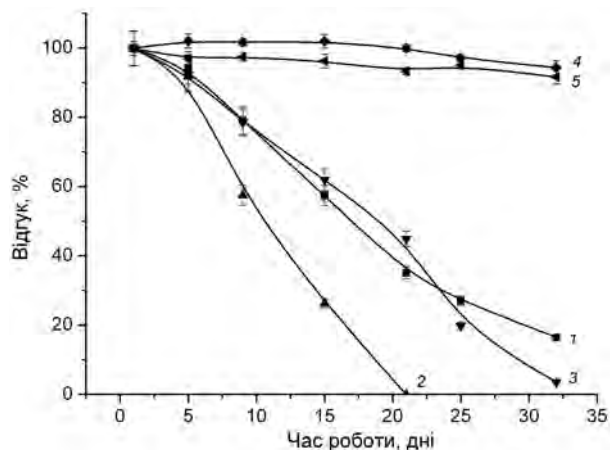


Рис. 6. Залежність відгуку біосенсорів, які зберігали в 5 мМ буфері при +4 °С (1) та +20 °С (2), у сухому стані при +20 °С (3), -4 °С (4) та +4 °С (5), від часу їхньої роботи

буферному розчині, рН 6,0, при температурі +20 °С та +4 °С, а також у сухих умовах при температурі +20 °С, +4 °С та -4 °С. На третій день після створення сахарозних біосенсорів одержали відгук на внесення 1 мМ сахарози в модельний розчин, величину якого було прийнято за 100%. Подальші виміри проводили через певний проміжок часу (5–8 днів). Активність біосенсорів, які зберігали в сухих умовах при температурі -4 °С та +4 °С, залишалась майже стабільною упродовж місяця. Однак протягом 4 місяців зберігання їхня активність знизилась у 10 разів. Сахарозні біосенсори, що зберігались у фосфатному буфері при +4 °С та в сухих умовах при +20 °С, втрачали свою активність протягом місяця, тимчасом як біосенсори, що містились у фосфатному буфері при +20 °С, не давали відгуку на додавання сахарози вже на 20-й день.

До втрати активності розробленого триферментного біосенсора може призвести денатурація чи дезактивація хоча б одного ферменту в складі мембрани. Відомо, що іммобілізована глюкозооксидаза є високостабільною [9, 19], тому основними факторами,



які можуть знизити активність біосенсора, є дезактивація мутаротази або інвертази. Однією з причин втрати активності мутаротази може бути окиснення пероксидом водню, який генерується під час гідролізу глюкози глюкозооксидазою [20]. Також у роботі [19] було по-

казано, що стабільність саме інвертази є лімітуючим фактором стабільності всього біосенсора. Але в будь-якому разі створений нами сахарозний біосенсор при низьких температурах та в сухих умовах зберігання залишається у стабільному робочому стані довше, ніж при вищих температурах та зберіганні в буферному розчині, що й планується використати надалі.

Для виконання робіт із реальними зразками потрібно було також перевірити селективність розробленого сахарозного біосенсора. Було проведено низку дослідів із дослідження впливу інтерферуючих компонентів на відгук цукрозного біосенсора. Дослідження проводили в 10 мМ фосфатному буфері, рН 7,0. В експериментальну комірку вносили розчин з 1 мМ можливої інтерферуючої речовини (таблиця). Відгук сенсора розраховували у відсотках.

Селективність сахарозного біосенсора

Субстанції, 1 мМ	Відносний відгук сахарозного сенсора, %
Сахароза	100
Мальтоза	10
Лактоза	0
Глюкоза	165
Фруктоза	1
Сорбіт	0
Рамноза	0
Маніт	0
Арабіноза	0
Аскорбінова кислота	0

Загалом, сахарозний біосенсор виявився селективним стосовно інтерферуючих речовин, які можуть бути присутні в соках, за винятком глюкози. Величина відгуку сахарозного біосенсора на 1 мМ глюкози становила 165% порівняно з величиною відгуку на цукрозу тієї самої концентрації. Це цілком зрозуміло, оскільки до складу ферментної мембрани сахарозного біосенсора входить глюкозооксидаза.

Таким чином, уперше створено кондуктометричний біосенсор для визначення сахарози, в якому складна триферментна мембрана відіграє роль чутливого елемента, й оптимізовано його аналітичні характеристики для роботи з модельними розчинами. Розроблений кондуктометричний біосенсор характеризується високою операційною стабільністю та відтворюваністю сигналу.

Наступний етап роботи передбачає відпрацювання методики визначення сахарози в реальних зразках (сік, вино, мед тощо).

ЛІТЕРАТУРА

1. Schmid D. R., Scheller F. Biosensors. Application in medicine, environmental protection and process control. — Weinheim: VCH, 1990.
2. Tsao J.C.Y. New by-products from molasses // Sugar y Azucar. — 1964. — V. 59, N. 9. — P. 98–99.
3. Schiweck H. Zusammensetzung von Zuckerrubensmelassen // Zuckerindustrie. — 1994. — V. 119, N. 4. — P. 272–282.
4. Thielecke K. Zur Zusammensetzung von Rubensmelassen // Branntweinwirtschaft. — 1987. — V. 127, N. 13. — P. 193–195.
5. Herbreteau B., Lafosse M., Morin-Allory L., Dreux M. Automatic sugar analysis in the beet industry. Part I // High Res. Chromatogr. — 1990. — V. 13. — P. 239–243.
6. Verceclotti S. V., Clarke M. A. Comparison of modern and traditional methods of sugar analysis // Int. Sugar J. — 1994. — V. 96. — P. 437–445.
7. Lima Filho J. L., Pandey P. C., Weetall H. H. An amperometric flow injection analysis enzyme sensor for sucrose using a tetracyanoquinodimethane modifies graphite paste electrode // Biosensors Bioelectronics. — 1996. — V. 11. — P. 719–723.
8. Filipiak M., Fludra K., Gosciminska E. Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of an oxygen electrode // Ibid. — 1996. — V. 11. — P. 355–364.
9. Gouda M. D., Kumar M. A., Thakur M. S., Karanth N. G. Enhancement of operational stability of an enzyme biosensor for glucose and sucrose using protein based stabilizing agents // Ibid. — 2002. — V. 17. — P. 503–507.
10. Guemas Y., Boujtita M., el Murr N. Biosensor for determination of glucose and sucrose in fruit juices by flow injection analysis // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2000. — V. 89. — P. 81–89.
11. Enfors S.O. Oxygen-stabilized enzyme electrode for d-glucose in fermentation broths // Enzym. Microbiol. Technol. — 1981. — V. 3. — P. 29–34.
12. Barlikova A., Svorc J., Miertus S. Hybrid biosensor for the determination of sucrose // Anal. Chim. Acta. — 1991. — V. 247. — P. 83–89.
13. Шкотова Л. В., Солдаткин А. П., Дзядевич С. В. Адаптация амперометрического биосенсора для анализа глюкозы в винах // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, №3 — С. 114–121.
14. Van Os P. J. H. J., Bult A., van Bennekom W. P. A glucose sensor, interference free for ascorbic acid // Anal. Chim. Acta. — 1995. — V. 305. — P. 18–28.
15. Дзядевич С. В. Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування // Біополімери і клітина. — 2005. — Т. 21, №2 — С. 91–106.
16. Дзядевич С. В., Шульга А. А., Пацковський С. В. и др. Тонкопленочные кондуктометрические датчики для ферментативных биосенсоров // Электрохимия. — 1994. — Т. 30, № 8. — С. 982 — 987.
17. Солдаткин О. О., Сосовська О. Ф., Бенілова І. В. та ін. // Біополімери і клітина. — 2005. — Т. 21, №5. — С. 425–432.
18. Лурье Ю. Ю. Справочник по аналитической химии. — М.: Химия, 1967. — С. 230.
19. Haghghi B., Varma S., Alizadeh F. M. Prussian blue modified glassy carbon electrodes. Study on operational stability and its application as a sucrose biosensor // Talanta. — 2004. — N 64. — P. 3–12.
20. Scheller F.W., Hintsche R., Pfeiffer D. Biosensors: Fundamentals, applications and trends // Sens. Actuators. B. — 1991. — N 4. — P. 194–199.



**КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР
НА ОСНОВЕ ТРЕХФЕРМЕНТНОЙ СИСТЕМЫ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ САХАРОЗЫ**

*А. А. Солдаткин¹
В. Н. Пешкова^{1,2}
С. В. Дзядевич¹
А. В. Ельская¹*

¹Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
E-mail: alex_sold@yahoo.com

Приведены сведения о впервые созданном биосенсоре для определения сахарозы, в котором сложная трехферментная мембрана играет роль чувствительного элемента, иммобилизованного на кондуктометрический преобразователь. Время определения концентрации сахарозы в растворе — 1–2 мин. Динамический диапазон определения может изменяться в зависимости от буферной емкости и в 5 мМ фосфатном буферном растворе составляет 2 мкМ — 5 мМ сахарозы. Исследована зависимость работы биосенсора от pH и ионной силы раствора. Представлены также данные по селективности сенсора и хранению его в разных условиях. Разработанный кондуктометрический биосенсор характеризуется высокой операционной стабильностью и воспроизводимостью сигнала и пригоден для использования в реальных условиях.

Ключевые слова: сахароза, глюкоза, кондуктометрический биосенсор, инвертаза, мутаротаза, глюкозооксидаза.

**CONDUCTOMETRIC BIOSENSOR BASED
ON THE THREE-ENZYME SYSTEM
FOR DETERMINATION OF SUCROSE**

*O. O. Soldatkin¹
V. M. Peshkova^{1,2}
S. V. Dzyadevych¹
H. V. Elska¹*

¹Institute of Molecular Biology and Genetics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

²National Taras Shevchenko University, Kyiv
E-mail: alex_sold@yahoo.com

In the course of this study, a biosensor for sucrose determination, with a complex three-enzyme membrane representing a sensitive element immobilized onto a conductometric transducer, has been created. The time of determining sucrose concentration in the solution is 1–2 minutes. The dynamic range of determination may vary depending on buffer capacity and amounts to 2 μ M — 5 mM of sucrose in 5 mM of phosphate buffer solution. In this work the dependence on pH and ionic strength of the solution has been analyzed. The developed conductometric biosensor is characterized by high operational stability and repeatability of the response. The data on sensor selectivity and its storage in different conditions are presented as well. The sensor turned out to be suitable for usage in real-life environment.

Key words: sucrose, glucose, conductometric biosensor, invertase, mutarotase, glucoseoxidase.