

Оптимізація методики визначення сахарози в соках і солодких напоях кондуктометричним ферментним біосенсором

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

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03680, Україна

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Вул. Володимирська, 64, Київ, 01003, Україна

victoir@ukr.net

Розроблено та оптимізовано методику визначення сахарози в соках і солодких напоях кондуктометричним ферментним біосенсором. Підібрано оптимальне співвідношення та концентрацію ферментів у біоселективному елементі біосенсора для найбільшої його стабільності та чутливості. Розглянуто різні варіанти виявлення сахарози в зразках за допомогою біосенсора та проведено визначення сахарози та глюкози в соках і солодких напоях. Запропоновану методику можна надалі використовувати у харчовій промисловості для контролю і оптимізації виробництва.

Ключеві слова: кондуктометричний ферментний біосенсор, іммобілізовані ферменти, сахароза, глюкоза.

Вступ. Сахароза, глюкоза та інші вуглеводи входять до складу багатьох харчових продуктів, у тому числі фруктів, овочів і фруктових напоїв. Оскільки вміст цих вуглеводів саме у фруктах і овочах невідривно пов'язаний з умовами культивування і зберігання останніх, а також може бути індикатором їхньої зрілості та якості, існує потреба в добре налагодженій системі їхнього моніторингу [1]. Крім того, сахароза є основною компонентою меляси, яка інтенсивно використовується в харчовій, фармацевтичній і косметичній промисловості [2, 3] та в деяких процесах біотрансформації при біотехнологічному виробництві [4]. Меляса також є природним джерелом для одержання різних цінних продуктів, у першу чергу цукру [5]. Під час проходження процесу біотехнологічного виробництва (культивування, ферментація тощо) необхідно здійснювати постійний контроль за виходом про-

дукту, його складом і якістю. Постійний моніторинг біотехнологічних процесів необхідний для глибшого їх розуміння та оптимізації, а також контролю за їхнім проходженням.

У харчовій промисловості та медицині моніторинг сахарози здійснюють, в основному, за допомогою спектрометричних методів і високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), що потребує наявності висококваліфікованого персоналу та складної і дорогої апаратури [6]. Концентрацію сахарози також можна визначати ізотопним методом, газovo-рідинною хроматографією, але ці методи не розповсюджені, бо є дорогими та дуже складними і громіздкими [7]. Одним із основних недоліком зазначених підходів є необхідність у досить складній попередній підготовці проб перед аналізом. Поляриметричні та рефрактометричні методи визначення сахарози є швидкими, але менш точними [6]. До того ж вони досить чутливі до присутності в розчи-

нах низки інтерферуючих компонентів [8]. Тому на сьогодні постає дуже актуальне питання створення більш зручного, точного, селективного, швидкого та дешевого методу визначення вмісту цукру в різноманітних алкогольних і безалкогольних напоях і продуктах харчування.

На даний час існує досить значна кількість публікацій з розробки біосенсорів для визначення сахарози [6, 9–17]. Зокрема, у роботі [16] описано амперометричний сахарозний біосенсор для on-line контролю за процесом ферментативної біотрансформації глюкози у фруктозу за допомогою глюкозоізомерази. В літературі згадується і про можливість використання мультиферментних сенсорів для одночасного визначення декількох сахаридів у зразку, наприклад, сахарози, мальтози та глюкози за допомогою потенціометричного сенсора [11].

При розробці сахарозних біосенсорів використовували різноманітні біологічні матеріали та методи іммобілізації ферментів. Зокрема, в роботі [18] повідомляють про використання методу електрохімічної полімеризації фенілендіаміну на поверхню електродів для іммобілізації інвертази, мутаротази та глюкозооксидази. В публікації [9] авторами використано коіммобілізовані з глюкозооксидозою клітини дріжджів як джерело інвертази. Детектування в цьому випадку базувалося на поглинанні кисню. У роботі [12] йдеться про розробку нового методу іммобілізації ферментів на поверхню електродів. Ферменти (глюкозооксидаза, інвертаза, пероксидаза) зв'язують з хелатною сефарозою через різні іони металів та лектин конканавалін А. Цей спосіб іммобілізації дає можливість здійснювати елюцію та повторну іммобілізацію різних ферментів на поверхню датчика. За допомогою такої оборотної іммобілізації ферментів можна визначати різні субстрати в багатокомпонентному розчині.

Отже, на сьогодні більшість розроблених сахарозних біосенсорів є амперометричними [6, 9–17]. Але порівняно з кондуктометричними біосенсорами для визначення сахарози вони мають низку недоліків. Перш за все, це вимірювання з використанням високого потенціалу, що призводить до похибок через присутність у розчинах інших електроокиснювальних компонентів, таких, наприклад, як аскорбінова кислота. По-друге, існує

необхідність у технологічно складному та дорогому електроді порівняння і, по-третє, це необхідність роботи з високою напругою, що призводить до фарадеївських процесів на електродах. До того ж амперометричні біосенсори, як правило, є дорожчими при масовому виробництві порівняно з кондуктометричними.

У цілому кондуктометричні методи аналізу відносно інших електрохімічних біосенсорів є достатньо простими, зручними, точними та дозволяють вирішувати важливі науково-дослідні і виробничі завдання [19, 20]. У попередній роботі нами розроблено лабораторний прототип сахарозного кондуктометричного біосенсора [21]. Але для успішного застосування створеного кондуктометричного біосенсора для аналізу реальних зразків необхідно здійснити оптимізацію його аналітичних характеристик. Тому метою цієї роботи було відпрацювання методики визначення сахарози в реальних зразках за допомогою кондуктометричного біосенсора.

Матеріали і методи. У дослідженнях використовували препарати ліофілізованих ферментів: глюкозооксидаза (ГОД) *Penicillium vitale* (ЕС 1.1.3.4.) з активністю 130 од. акт/мг фірми «Діагностикум» (Україна); інвертаза (-фруктофуранозидаза, ЕС 3.2.1.26) пекарських дріжджів з активністю 355 од. акт/мг фірми «Sigma-Aldrich Chemie» (ФРН); мутаротаза (ЕС 5.1.3.3.) з активністю 100 од. акт/мг фірми «Biozyme Laboratories Ltd» (Англія). Бичачий сироватковий альбумін (БСА) (фракція V) та 50 %-й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) отримано від фірми «Sigma-Aldrich Chemie». Субстратом і речовиною для аналізу слугувала сахароза, буфер містив калій-фосфатний розчин ($\text{K}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$), рН 6,3, фірми «Merck» (ФРН). Інші неорганічні сполуки були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «х. ч.» і «ч. д. а.».

Використано кондуктометричні перетворювачі, виготовлені згідно з нашими рекомендаціями та по ескізах в Інституті фізики напівпровідників ім. Лашкарьова (Україна). Вони складаються з двох ідентичних пар золотих гребінчастих електродів, виготовлених вакуумним напиленням золота на основу з ситалу розміром 5 × 40 мм (рис. 1). Чутлива

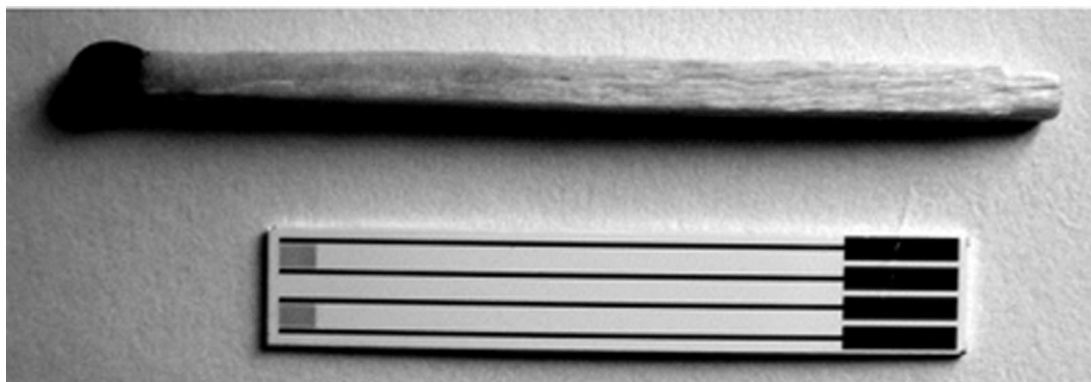


Рис. 1. Зовнішній вигляд кондуктометричних планарних гребінчастих перетворювачів

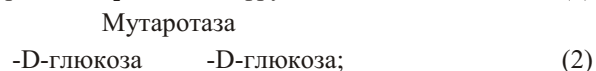
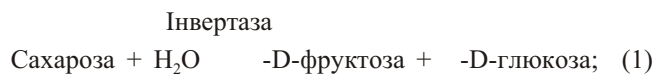
поверхня кожної електродної пари була приблизно 1,0–1,5 мм. Відстань між пальцями гребінок та ширина самих пальців складала 20 мкм.

Для виготовлення робочої мембрани готували розчин з різним вмістом ферментів (інвертази, мутаротази та глюкозооксидази) у 40 мМ фосфатному буфері, рН 7,4, з 20 %-м гліцерином. Суміш для приготування референтної мембрани одержували таким же чином, але замість зазначених ферментів додавали БСА. Перед нанесенням на поверхню перетворювача приготувані розчини (для референтної і робочої мембран) змішували з водним розчином ГА різної концентрації у співвідношенні 1:1. Отримані розчини відразу ж наносили на робочу частину перетворювачів. Обидві мембрани були з однаковим вмістом білка. Далі сенсори висушували протягом різного часу на повітрі за кімнатної температури. Перед початком роботи для вимивання надлишку ГА сенсор вміщували в буферний розчин, де й виконували наступні досліди.

Блок-схему вимірювальної установки зображено на рис. 2. З низькочастотного генератора сигналів ГЗ-118 (Україна) подається змінна напруга з частотою 100 кГц та амплітудою 10 мВ на гребінчасті електроди (диференційна пара), які знаходяться в комірці з досліджуванним розчином. Отриманий сигнал на електродах сенсора знімається з опорів навантаження $R_n = 1$ кОм та через диференційний підсилювач Unipan-233-6 (Польща) потрапляє на селективний нановольтметр Unipan-233 (Польща). Після цього сигнал подається на реєструючий пристрій. Протягом експериментів вимірювали залежність амплітуди вихідного сигналу від концентрації субстрату в розчині.

Вимірювання здійснювали в 10 мМ калій-фосфатному буферному розчині, рН 6,3, при кімнатній температурі у відкритій комірці з інтенсивним перемішуванням. Спочатку сенсор розміщували в комірці для вимірювання об'ємом 2 мл, заповненій фосфатним буферним розчином. Для отримання стабільного початкового сигналу (базової лінії) сенсор вимочували деякий час у буферному розчині. Потім для отримання сигналу на субстрат необхідної концентрації в комірку додавали певну аліквоту стандартного концентрованого вихідного розчину субстрату (сахарози чи глюкози) або певну аліквоту соку. Неспецифічні зміни вихідного сигналу, пов'язані з коливаннями температури, рН середовища, коливаннями напруги в мережі, нівелювалися завдяки використанню в роботі диференційного режиму вимірювань, тобто вимірювали різницю сигналів з двох пар електродів з активною і неактивною мембраною, розташованих на одному перетворювачі. Дослідження проводили щонайменше у трьох повторностях.

Результати і обговорення. В основі роботи кондуктометричного біосенсора для визначення сахарози лежить каскад ферментативних реакцій:



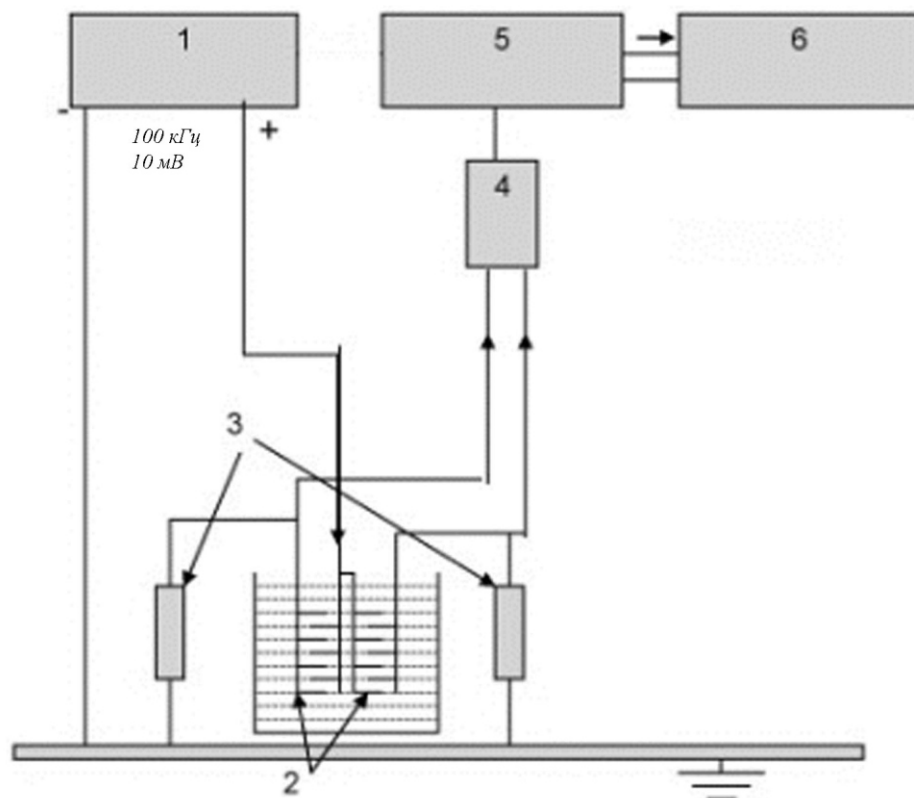


Рис. 2. Схема експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань: 1 – генератор; 2 – електроди; 3 – опори навантаження; 4 – диференційний підсилювач; 5 – фазочутливий нановольтметр; 6 – реєструючий пристрій

Інвертаза, мутаротаза і глюкозооксидаза поступово розщеплюють сахарозу до перекису водню та D-глюконолактону. Глюконолактон в свою чергу спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, яка дисоціює на залишок кислоти і протон, при цьому змінюється провідність розчину, яку й можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача [22].

Робочі характеристики кондуктометричного біосенсора залежать від складу і методу іммобілізації ферментної мембрани. Наприклад, величина відгуків біосенсора на глюкозу та сахарозу залежить не лише від активності відповідних ферментів і дифузійних процесів у біоселективній матриці, а й від співвідношення цих ферментів у мембрані біосенсора. Тому першим етапом роботи була оптимізація ферментного складу мембрани біосенсора для визначення сахарози до такого рівня, при якому його чутливість була б найбільшою та величини відгуків на глюкозу і сахарозу збігалися.

Спочатку підбирали оптимальний процентний вміст мутаротазу у складі ферментної мембрани.

Для цього готували гелі з різною концентрацією мутаротазу в 40 мМ фосфатному буфері (рН 7,4) з 20 %-м гліцерином. Концентрація ГОД в свою чергу була сталою і складала 5 %. Таку концентрацію обрано за даними роботи [23], де показано, що вона є оптимальною для визначення глюкози, оскільки саме при таких параметрах досягається оптимальне співвідношення чутливості і динамічного діапазону роботи сенсора. Суміш для приготування референтної мембрани була такою ж, однак замість ферментів вона містила БСА, тобто обидві мембрани були з однаковим вмістом білка. Перед нанесенням на поверхню перетворювача підготовлені розчини (для референтної і робочої мембран) змішували з 2 %-м водним розчином ГА у співвідношенні 1:1. Отримані розчини зразу ж наносили на робочу частину перетворювачів. Потім сенсори висушували протягом 2 год на повітрі за кімнатної температури. Перед проведенням вимірів у робочу комірку вносили інвертазу в надлишку. Далі одержували відгуки сахарозного сенсора на 1 мМ глюкозу та 1 мМ сахарозу. З даних рис. 3, а, видно, що при концен-

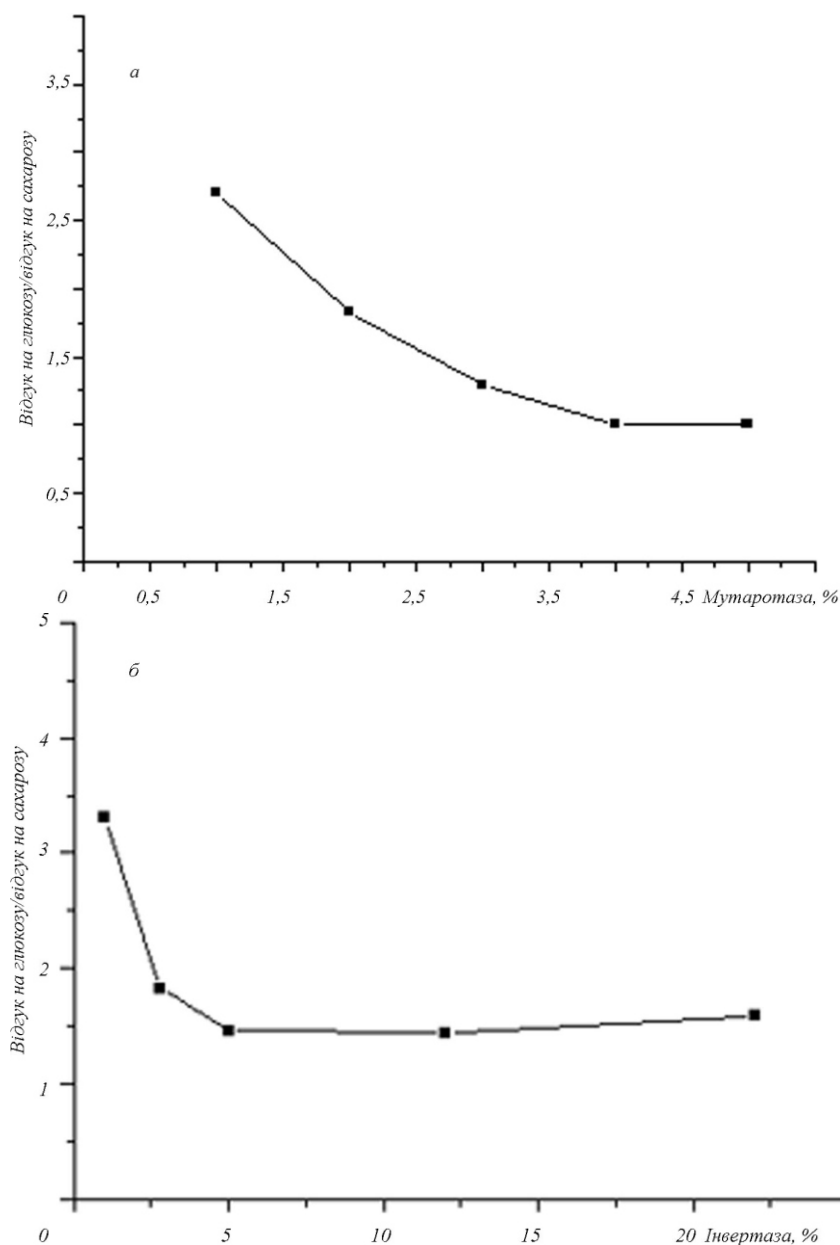


Рис. 3. Залежність відношення відгуків на глюкозу та сахарозу від вмісту мутаротази (а) та інвертази (б) у складі ферментної мембрани. Вимірювання проводили у 10 мМ фосфатному буфері, рН 6,3, концентрація субстрату 1 мМ

трації мутаротази 4 % та вище відгуки сахарозного біосенсора на глюкозу і сахарозу набувають однакової величини, тому саме це значення використано у подальших дослідженнях.

Наступним етапом роботи був підбір оптимальної концентрації інвертази у складі ферментної мембрани сенсора. Для цього готували гелі з різною концентрацією інвертази, до складу яких входила мутаротаза та ГОД у постійній концентрації 4 і 5 % відповідно. З даних рис. 3, б, випливає, що при 5 %-му вмісті інвертази у складі ферментної мембрани співвідношення відгуку сенсора на глюкозу

до відгуку на сахарозу є найближчим до 1. При збільшенні концентрації інвертази у складі ферментної мембрани співвідношення відгуку сенсора на глюкозу порівнянно з відгуком на сахарозу дещо збільшується. Отже, оптимальна концентрація інвертази у складі ферментної мембрани становить 5 %, що і використано далі для приготування ферментної мембрани.

Мета дослідження полягала у відпрацюванні методики роботи кондуктометричного біосенсора з реальними зразками соків, тому основну увагу було приділено саме цьому питанню. Оскільки до складу

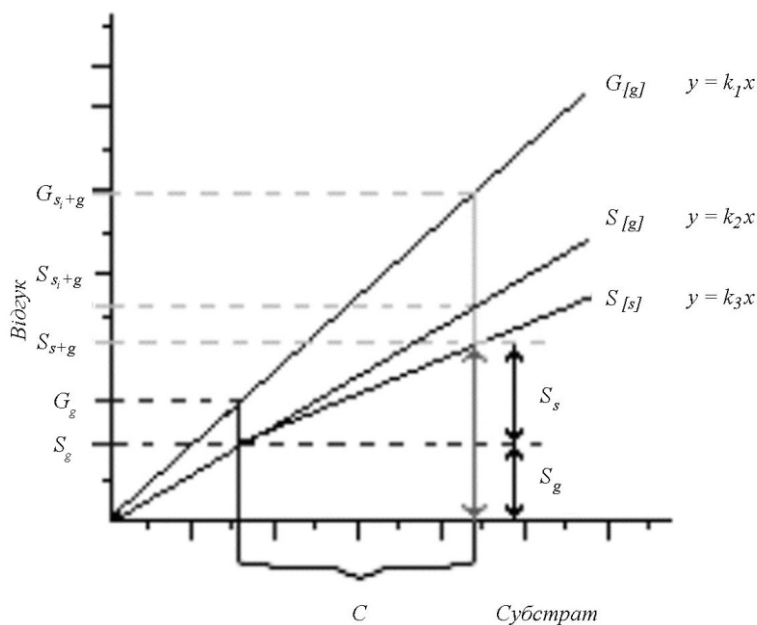


Рис. 4. Схематичне представлення залежностей відгуків сахарозного сенсора від концентрації сахарози ($S_{[si]}$) і глюкози ($S_{[gl]}$) та глюкозного сенсора від концентрації глюкози ($G_{[gl]}$) в розчині. Позначення: S – сахарозний сенсор; G – глюкозний сенсор; s – сахароза; s_i – розщеплена сахароза до глюкози; g – глюкоза; G_g – відгук глюкозного сенсора після внесення аліквоти соку у комірку для дослідження; G_{si+g} – відгук глюкозного сенсора після внесення аліквоти соку, до якого додали інвертазу, яка розщеплює сахарозу до глюкози; S_{s+g} – сигнал сахарозного сенсора на внесення у комірку аліквоти соку, який складається з суми сигналів на сахарозу (S_s) та глюкозу (S_g), присутню в соку

ферментної мембрани сахарозного біосенсора входить ГОД, то основну помилку на відгук сахарозного біосенсора спричинює саме глюкоза, яка присутня у досліджуваних зразках (соках) разом з іншими сахаридами.

Є декілька способів вирішення цієї проблеми:

- іммобілізація ГОД у зовнішньому шарі мембрани, який буде розщеплювати глюкозу, присутню в розчині, до того як вона досягне внутрішнього (чутливого до сахарози) ферментного шару;

- застосування системи проточного аналізу, в якому реактор з ГОД розташований попереду сахарозного детектора і також розщеплює глюкозу. Загалом, це система, подібна до першого випадку;

- використання окремого глюкозного сенсора для визначення концентрації вільної глюкози в розчині та подальшого визначення різниці між сигналами двох ферментних сенсорів, перший з яких дає відгук і на глюкозу, і на сахарозу, а другий – лише на глюкозу.

Для визначення сахарози в соках обрано останній метод, який є простішим та зручнішим у виконанні і не потребує додаткових елементів системи чи маніпуляцій. Крім того, глюкозний біосенсор використовували як контрольний датчик, тому що в попередніх роботах показано високу достовірність результатів, отриманих за його допомогою [24]. Це, в свою чергу, стало підставою для за-

стосування глюкозного сенсора для перевірки даних, отриманих сахарозним сенсором.

Досліджували декілька можливих випадків і варіантів визначення сахарози у реальних зразках. По-перше, розглянуто випадок, коли відгуки сахарозного та глюкозного сенсорів на одну й ту саму концентрацію глюкози між собою не збігалися, що відбувається досить часто. Це необхідно було для розробки методики вимірювань сахарози з урахуванням подальшої автоматизації вимірів та їхнього проведення в режимі реального часу.

Перед початком вимірювання сахарози в соках здійснювали калібрування глюкозних і сахарозних сенсорів (рис. 4). Будували лінійні калібрувальні графіки глюкозного та сахарозного біосенсорів на глюкозу, які відповідають функціям $y = k_1x$ та $y = k_2x$ відповідно. Коефіцієнт співвідношення цих двох функцій (K) розраховано діленням функції $y = k_1x$ на $y = k_2x$:

$$K = k_2x/k_1x = k_2/k_1. \tag{5}$$

При отриманні сигналу глюкозного сенсора на певну концентрацію глюкози та множенні його на коефіцієнт співвідношення K одержано значення, яке відповідає тій величині сигналу, яку дає сахарозний сенсор на ту ж концентрацію глюкози.

З даних рис. 4 і формули (5) випливає:

$$S_{s+g} = S_s + S_g; \tag{6}$$

$$S_g = G_g \cdot K, \quad S_{s+g} = G_{s+g} \cdot K; \quad (7)$$

$$S_s = S_{s+g} - G_g \cdot K. \quad (8)$$

Підставляючи значення S_s у калібрувальну криву для сахарози ($S_{[s]}$), можна знайти концентрацію сахарози в соку (c). Калібрувальна крива сахарозного біосенсора на сахарозу ($S_{[s]}$) відповідає функції $y = k_3 x$.

Звідси

$$c = S_s/k_3 = (S_{s+g} - G_g \cdot K)/k_3 \text{ (експеримент);} \quad (9)$$

$$c = (G_{s+g} - G_g)/k_1 \text{ (контроль).} \quad (10)$$

Якщо ж відгуки біосенсора на одну й ту ж концентрацію глюкози і сахарози збігаються ($K = 1$), то рівняння (9) спрощуються:

$$c = S_s/k_3 = (S_{s+g} - G_g)/k_3. \quad (11)$$

Проілюструємо наведену вище методику визначення концентрації сахарози в соках на експерименті. Для цього здійснено низку дослідів з відомими концентраціями субстратів. Похибка експерименту становила близько 4 %. Лінійність калібрувальної кривої глюкозного кондуктометричного біосенсора спостерігається в межах від 0,001 до 1,5–2,5 мМ глюкози, а сахарозного – від 0,001 до 2,5–10 мМ залежно від умов проведення експериментів [21]. При вищих концентраціях глюкози та сахарози відбувалося насичення величини сигналу біосенсора. Але, як відомо, концентрація глюкози та сахарози в соках змінюється від 15 до 700 мМ. У зв'язку з цим необхідно розводити зразок соку при його вимірюванні через вузький динамічний діапазон сенсорів.

Перед початком вимірювань глюкозний сенсор розміщують у комірці (об'єм 2 мл) для вимірювання, заповненій 10 мМ фосфатним буфером, рН 6,3, та витримують протягом декількох хвилин до отримання базової лінії. Після цього додають певну аліквоту соку (1 мкл) для отримання 2000-разового його розведення в буферному розчині. Одержаний сигнал від глюкозного сенсора (G_g) перемножують

на коефіцієнт K , попередньо розрахований з калібрувальних кривих глюкози для глюкозного і сахарозного біосенсорів (формула (5)). У результаті отримуємо значення S_g , яке дорівнює сигналу сахарозного сенсора лише на глюкозу в соку. Також з калібрувального графіка глюкозного сенсора на глюкозу ми отримуємо концентрацію глюкози в соку. Потім беремо сахарозний сенсор і отримуємо сигнал (S_{s+g}) (за аналогією з глюкозним сенсором) на внесення тієї ж аліквоти соку (1 мкл). Оскільки сенсор для визначення сахарози реагує як на глюкозу, так і на сахарозу, які завжди присутні в соках, то сигнал (S_{s+g}) дорівнює сумі двох сигналів: на глюкозу (S_g) та сахарозу (S_s). При відніманні S_g від S_{s+g} ми отримуємо значення S_s , яке відповідає сигналу сахарозного сенсора лише на сахарозу, присутню в соку: $S_s = S_{s+g} - S_g$ (рис. 4). Далі за калібрувальним графіком сахарозного сенсора на сахарозу визначаємо концентрація сахарози в соках.

Отримані дані перевіряли контрольним методом з використанням тільки глюкозного сенсора. Для цього в сік спочатку додавали інвертазу, яка каталізує розщеплення сахарози на глюкозу та фруктозу. При розщепленні однієї молекули сахарози утворюється одна молекула глюкози. Цій суміші дають вистоятися біля 2 год для спонтанного перетворення α -D-глюкози в β -D-глюкозу. Потім за допомогою глюкозного сенсора отримуємо сигнал S_{s+g} (відгук на глюкозу та розщеплену сахарозу) на внесення 1 мкл соку з доданою до нього інвертазою, від якого віднімаємо раніше одержане значення S_g (відгук на глюкозу). При екстраполяції отриманого відрізка на вісь x знаходимо значення, що відповідає концентрації сахарози в соку, яке порівнюємо зі значенням, одержаним за допомогою сахарозного біосенсора.

Результати досліджень переконали нас у доцільності використання розробленої нами методики для подальшого проведення аналізу концентрації сахарози в соках.

Визначення сахарози та глюкози в соках проводили також методом стандартних додавань [25]. Для цього проаналізовано варіант визначення сахарози в зразках, коли використовували глюкозні та сахарозні сенсори з однаковими відгуками на глюкозу. Спочатку отримували сигнал глюкозним сен-

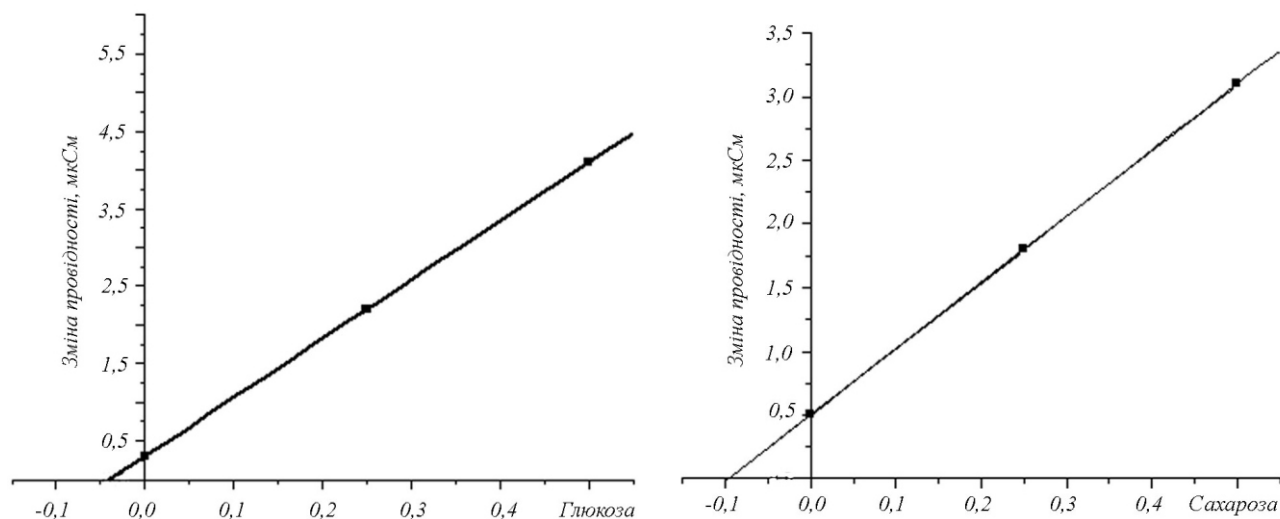


Рис. 5. Визначення концентрації глюкози у зразку глюкозним сенсором (а) та сахарози – сахарозним біосенсором (б) методом стандартних додавань. Вимірювання проводили у 10 мМ фосфатному буфері, рН 6,3

сором на 1 мкл соку та на декілька почергових внесень 0,25 мМ глюкози в комірку. Далі будували графік залежності зміни провідності від субстрату (рис. 5, а) у вигляді прямої, точка перетину якої з віссю абсцис відповідала концентрації глюкози в зразку, попередньо розведеної в 2000 разів.

Після цього одержували сигнал сахарозним сенсором на 1 мкл соку, який складався з загальної відповіді сенсора на глюкозу та сахарозу. Від нього віднімали сигнал, отриманий раніше на глюкозу глюкозним сенсором. Одержану величину відклали по осі ординат та аналогічним способом (методом стандартних додавань) знаходили концентрацію сахарози в соку (рис. 5, б).

Перевірку наших результатів здійснювали контрольним методом, використовуючи тільки глюкозний сенсор. Для цього спочатку в сік додавали інвертазу, яка каталізує розщеплення сахарози на глюкозу і фруктозу. При розщепленні однієї молекули сахарози утворюється одна молекула глюкози. Суміш відстоюють біля 2 год для спонтанного перетворення α -D-глюкози в β -D-глюкозу. Далі отримують сигнал глюкозним сенсором на 1 мкл соку, що складається з загальної відповіді сенсора на вже присутню глюкозу та розщеплену до глюкози сахарозу, від якого віднімають сигнал на глюкозу, одержаний раніше глюкозним сенсором. Отриману ве-

личину відкладають по осі ординат та аналогічно (методом стандартних додавань) знаходять концентрацію сахарози в соку, яку потім порівнюють з даними сахарозного сенсора.

Отже, наведений вище метод визначення сахарози в досліджувальних зразках виявився найбільш оптимальним, зручним та простим, тому його і використовували для подальших вимірів сахарози та глюкози в соках та солодких напоях. Результати цих вимірів представлено на рис. 6. Похибка вимірювання не перевищувала 10 %.

Висновки. Підібрано оптимальні концентрації ферментів у біоселективному елементі сахарозного кондуктометричного біосенсора для найбільшої його стабільності та чутливості, які відповідали 5 % глюкозооксидази, 4 % мутаротази та 5 % інвертази. Відпрацьовано методику роботи кондуктометричного сахарозного та глюкозного біосенсорів з реальними зразками соків і солодких напоїв. Детально розглянуто різні варіанти визначення сахарози в зразках соків і солодких напоїв біосенсорним методом; виведено формулу перерахунку даних. У роботі представлено також результати вимірювань сахарози та глюкози біосенсорним методом в соках і солодких напоях. Похибка вимірювання не перевищувала 10 %. Розроблений та оптимізований нами сахарозний біосенсор у поєднанні з глюкозним

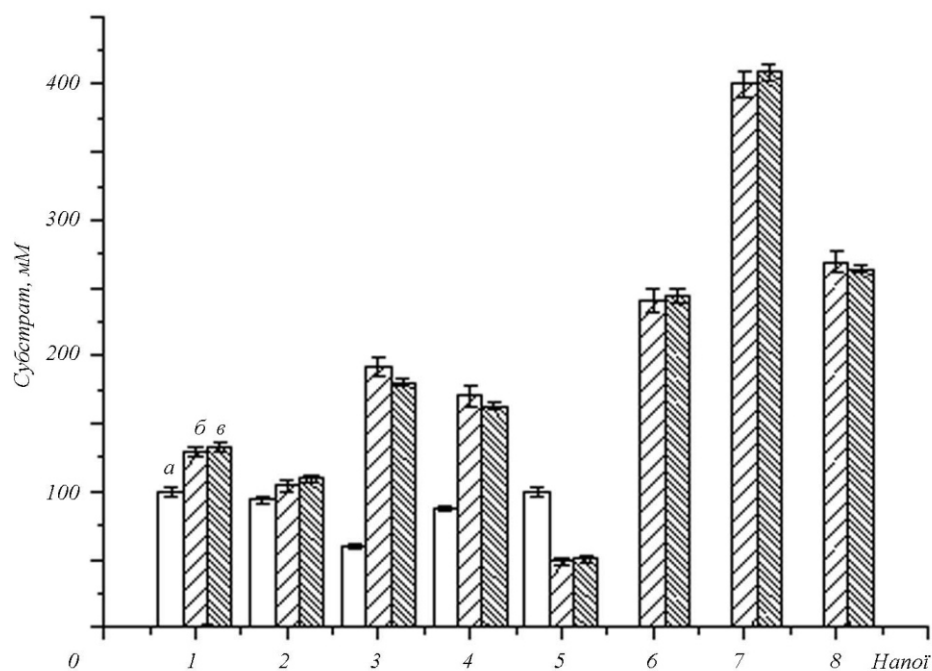


Рис. 6. Визначення концентрації глюкози та сахарози у зразках глюкозним і сахарозним сенсорами: 1 – ананасовий нектар «Соковита»; 2 – апельсиновий нектар «Соковита»; 3 – абрикосовий сік «Біола»; 4 – апельсиновий сік «Rich»; 5 – яблучний сік «Одеський завод»; 6 – «Кока-Кола»; 7 – «Фанта»; 8 – «Дюшес» (а – глюкоза; б – сахароза; в – контроль по сахарозі)

можна використовувати в подальшому у харчовій промисловості для контролю та оптимізації біотехнологічних процесів.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технічних потреб».

V. N. Peshkova, A. A. Soldatkin, S. V. Dzyadevych

Optimization of sucrose measurement working procedure in real samples using conductometric enzyme biosensor

Summary

The working procedure of sucrose and glucose conductometric biosensors with real samples of juices and sweet drinks has been presented. For the purpose of sensitivity and stability improvement of the sucrose biosensor, optimal enzyme proportions and concentrations in its bioselective element have been chosen. Different variants of determination of sucrose and glucose in real samples using the biosensor have been considered. The sucrose and glucose measurement has been carried out in juices and sweet drinks. The method suggested could be used in food industry for the production control and optimization.

Keywords: conductometric enzyme biosensor, immobilized enzymes, sucrose, glucose.

V. N. Peshkova, A. A. Soldatkin, S. V. Dzyadevych

Optimization of sucrose measurement working procedure in real samples using conductometric enzyme biosensor

Резюме

Разработана и оптимизирована методика определения сахарозы в соках и сладких напитках с помощью кондуктометрического ферментного биосенсора. Подобраны оптимальное соотношение и концентрации ферментов в биоселективном элементе биосенсора для наибольшей его стабильности и чувствительности. Рассмотрены разные варианты выявления сахарозы в образцах с помощью биосенсора и проведено определение сахарозы и глюкозы в соках и сладких напитках. Предложенную методику можно использовать в дальнейшем в пищевой промышленности для контроля и оптимизации производства.

Ключевые слова: кондуктометрический ферментный биосенсор, иммобилизованные ферменты, сахароза, глюкоза.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Скрышевская И. В., Корпан Я. И., Солдаткин А. П. Применение ферментного сенсора на основе pH-чувствительных полевых транзисторов для определения концентрации глюкозы в соке картофеля // Биополімери і клітина.–2003.–**19**, № 6.–С. 553–557.
2. Schiweck H. Zusammensetzung von Zuckerbenmelassen // Zuckerindustrie.–1994.–**119**, N 4.– P. 272–282.
3. Thielecke K. Zur Zusammensetzung von Rubenmelassen // Branntweinwirtschaft.–1987.–**127**, N 13.–P. 193–195.

4. Schmid D. R., Scheller F. Biosensors. Application in medicine, environmental protection and process control.–Weinheim: VCH, 1990.–350 p.
5. Tsao J. C. Y. New by products from molasses // Sugar y azucar.–1964.–**59**, N 9.–P. 98–99.
6. Surareungchai W., Worasing S., Sritongkum P., Tanticharoen M., Kirtikara K. Dual electrode signal-subtracted biosensor for simultaneous flow injection determination of sucrose and glucose // Anal. Chim. Acta.–1999.–**380**.–P. 7–15.
7. Douglas W., Lowman, Maciel G. E. Determination of sucrose in sugar beet juices by nuclear magnetic resonance spectrometry // Anal. Chem.–1979.–**51**, N 1.–P. 85–91.
8. Thevenot D. R., Toth K., Durst R. A., Wilson G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (Technical report) // Pure Appl. Chem.–1999.–**71**.–P. 2333–2348.
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 // Biosensors and Bioelectronics.–2002.–**17**.–P. 503–507.
10. Mutlu S., Alp B., Ozmelles R. S., Mutlu M. Amperometric determination of enzymatic activity by multienzyme biosensors // J. Food Engin.–1997.–N 33.–P. 81–86.
11. Aoki K., Uchida H., Katsube T., Ishimaru Y., Iida T. Integration of bienzymatic disaccharide sensors for simultaneous determination of disaccharides by means of light addressable potentiometric sensor // Anal. Chim. Acta.–2002.–**471**.–P. 3–12.
12. Sosnitza P., Farooqui M., Saleemuddin M., Ulber R., Scheper T. Application of reversible immobilization techniques for biosensors // Anal. Chim. Acta.–1998.–**368**.–P. 197–203.
13. Sosnitza P., Irtel F., Ulber R., Busse M., Faurie R., Fischer L., Scheper T. Sandwich enzyme membranes for amperometric multi-biosensor applications: improvement of linearity and reduction of chemical cross-talk // Biosensors and Bioelectronics.–1998.–**13**.–P. 1251–1255.
14. Bertocchi P., Ciranni E., Compagnone D., Magearu V., Palleschi G., Pirvutoiu S., Valvo L. Flow injection analysis of mercury(II) in pharmaceuticals based on enzyme inhibition and biosensor detection // J. Pharm. and Biomed. Anal.–1999.–**20**.–P. 263–269.
15. Mohammadi H., Amine A., Cosnier S., Mousty Ch. Mercury-enzyme inhibition assays with an amperometric sucrose biosensor based on a trienzymatic-clay matrix // Anal. Chim. Acta.–2005.–**543**.–P.143–149.
16. Sosnitza P., Irtel F., Ulber R., Busse M., Faurie R., Fischer L., Scheper T. Flow injection analysis system for the supervision of industrial chromatographic downstream processing in biotechnology // Biosensors and Bioelectronics.–1998.–**13**.–P. 1251–1255.
17. Guemas Y., Boujtita M., Murr N. E. Biosensor for determination of glucose and sucrose in fruit juices by flow injection analysis // Appl. Biochem. and Biotechnol.–2000.–**89**.–P. 171–180.
18. Klinchan S., Choti Wongpipat W., Suwannakum T. Construction of sensor chip by electrochemical polymerization techniques for sucrose determination // J. КМІТЕНВ.–2002.–**12**, N 1.–P. 12–16.
19. Дзядевич С. В., Солдаткін О. П. Кондуктометричний метод у ферментативному каталізі // Укр. біохім. журн.–1994.–**66**, № 4.–С. 30–42.
20. Дзядевич С. В. Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування // Біополімери і клітина.–2005.–**21**, № 2 – С. 91–106.
21. Солдаткін О. О., Пішкова В. М., Дзядевич С. В., Єльська Г. В. Кондуктометричний біосенсор на основі трьохферментної системи для визначення цукрози в модельних розчинах // Біотехнологія.–2007–**1**, № 1.
22. Дзядевич С. В., Шульга А. А., Пацковський С. В., Архипова В. Н., Солдаткін А. П., Стриха В. І. Тонкопленочний кондуктометричний датчик для ферментних біосенсоров // Електрохімія.–1994.–**30**, № 8.–С. 982–987.
23. Дзядевич С. В., Солдаткін О. П., Архипова В. М., Шульга О. А., Єльська Г. В. Кондуктометричний ферментний глюкосенсор. Пошук шляхів поліпшення аналітичних характеристик // Укр. біохім. журн.–1995.–**67**, № 6.–С. 53–59.
24. Архипова В. М. Оптимізація основних характеристик кондуктометричних ферментних біосенсоров для аналізу реальних зразків: Автореф. дис. ... канд. біол. наук.–К., 1998.–19 с.
25. Dzyadevich S. V., Korpan Y. I., Arkhipova V. N., Alesina M. Y., Martelet C., El'skaya A. V., Soldatkin A. P. Application of enzyme field-effect transistors for determination of glucose concentration in blood serum // Biosensors and Bioelectronics.–1999.–**14**.–P. 283–287.

УДК.577.15.543.555

Надійшла до редакції 31.08.07