

Використання L-лактат-цитохром с-оксидоредуктази для створення амперометричного біосенсора при визначенні L-лактату

Т. Б. Горюшкіна^{1,2}, А. П. Орлова^{1,2}, О. В. Смуток³, М. В. Гончар^{3,4},
О. П. Солдаткін¹, С. В. Дзядевич¹

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

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

³Інститут біології клітини НАН України
Вул. Драгоманова, 14/16, Львів, Україна, 79005

⁴Zakład Biotechnologii, Zamiejscowy Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Rzeszowski
Kolbuszowa, Polska

Мета. Розробити амперометричний біосенсор для визначення L-лактату на основі L-лактат-цитохром с-оксидоредуктази (флавоцитохрому b_2 , ФЦ b_2) дріжджів *Hansenula polymorpha*. **Методи.** Експерименти проведено з використанням амперометричного методу вимірювання. Для іммобілізації ФЦ b_2 на поверхню електродів застосовано методи електрохімічної полімеризації та іммобілізації в парах глутарового альдегіду. **Результати.** Обрано препарат ферменту ФЦ b_2 , який після іммобілізації у полі-3,4-етилендіокситіофені демонструє найкращі робочі характеристики. Досліджено селективність, операційну стабільність та стабільність при зберіганні створеного біосенсора, встановлено рН-оптимум його роботи. За допомогою розробленого високостабільного біосенсора проаналізовано концентрацію L-лактату у модельних розчинах та зразках вина. **Висновки.** Біосенсор на основі ФЦ b_2 , перевагою якого є висока стабільність, можна застосовувати для аналізів крові та інших рідин, які не містять етанолу, а після оптимізації селективності біосенсора – і для аналізу вина.

Ключові слова: амперометричний біосенсор, флавоцитохром b_2 , L-лактат.

Вступ. На сьогодні розробка амперометричного біосенсора для аналізу L-лактату в біологічних зразках у харчовій промисловості, особливо у виноробстві, є важливим та актуальним завданням. Традиційні методи визначення концентрації молочної кислоти у суслі та вині (рідинна хроматографія, капілярний електрофорез, спектрофотометричний і ферментативний методи) часто не забезпечують необхідної селективності та чутливості аналізу. Крім того, через складність і громіздкість

обладнання, необхідність спеціальної підготовки проби та значну трудомісткість аналітичної процедури ці методи досить важко ввести безпосередньо до технологічного процесу виробництва вина [1]. Водночас L-лактат належить до речовин, концентрацію яких потрібно суворо контролювати протягом усіх стадій виноробства, адже він є одночасно індикатором бактерійної активності під час ферментації сусла та важливим чинником, який впливає на смак і аромат кінцевого продукту та його стабільність при зберіганні [1, 2].

Зручним інструментом для вибіркового та постійного моніторингу L-лактату під час виробництва вина може стати амперометричний біосенсор – прилад, який має невеликі розміри, є простим і дешевим у використанні та не потребує попередньої підготовки проби, складного устаткування і високої кваліфікації обслуговуючого персоналу [3]. Безумовними перевагами застосування біосенсорів у харчовій промисловості є також висока чутливість, незалежність їхньої роботи від мутності аналізованого розчину, висока сумісність із сучасними мікроелектронними технологіями та мінімальні потреби в енергії [4]. Тому не дивно, що останніми роками біосенсори набувають все ширшого застосування для аналізу якості продуктів у харчовій промисловості, у тому числі й у виноробстві [5].

Найчастіше амперометричні біосенсори для визначення L-лактату у вині розробляють на основі NAD^+ -залежної лактатдегідрогенази (ЛДГ) або лактатоксидази (ЛОД). Аналіз робочих характеристик біосенсорів, створених із застосуванням даних ферментів, свідчить про те, що датчики з іммобілізованою ЛОД мають ширший лінійний діапазон та нижчу межу детекції у порівнянні з датчиками на основі ЛДГ. Суттєвою перевагою оксидазних біосенсорів є також незалежність їхньої роботи від наявності екзогенного кофактора, що значно спрощує процес аналізу [3]. Відповідно розробка лактатного амперометричного біосенсора для аналізу вина на основі іммобілізованої ЛОД або інших безкофакторних ферментів виглядає значно перспективнішою.

Нещодавно нами розроблено амперометричний біосенсор для кількісного визначення L-лактату у вині на основі іммобілізованої ЛОД [2]. Він продемонстрував відмінні робочі характеристики: динамічний діапазон роботи у межах концентрації лактату 0,008–1,0 мМ та високу селективність. Створений датчик на основі ЛОД успішно застосовано для визначення вмісту лактату у вині та вино-матеріалі. Результати, отримані за допомогою біосенсора, корелювали з даними традиційного методу аналізу лактату – високоефективної рідинної хроматографії.

Однак недоліками вищезазначеного біосенсора [2] виявилися низька операційна стабільність та не-

достатня стабільність при зберіганні: датчик на основі ЛОД за перші 3 год безперервної роботи втрачав до 70 % від свого початкового сигналу, і даний показник активності зберігався протягом наступних 3 діб. Відмітимо, що 30 %-го рівня активності біосенсора зазвичай достатньо для визначення вмісту лактату у вині. Проте для оптимізації лактатного біосенсора постала необхідність у пошуку шляхів підвищення його стабільності.

За аналізом літературних даних визначено, що невисока операційна стабільність досить часто притаманна біосенсорам, створеним на основі іммобілізованої ЛОД. Наприклад, у роботі [6] встановлено, що оксидазний біосенсор для аналізу лактату у вині після 150 вимірювань зберігає лише 35 % від початкової активності. В інших дослідженнях показано, що датчик з ЛОД втрачає половину активності вже після проведення першого вимірювання [7], а через 5 год безперервної роботи демонструє 40 % вихідного сигналу [8].

Падіння активності іммобілізованого ферменту може спричинити низка факторів: температурна денатурація, протеолітична деградація, неспецифічне окиснення, яке каталізується металами, зміни рН, іонної сили розчину тощо [9]. Окрім того, до зменшення величини сигналу біосенсора протягом його тривалої роботи частково призводить сорбція на електроді сторонніх білків або інших речовин, які містяться в аналізованому розчині [8]. Звичайно, ідеальним підходом для підвищення стабільності біосенсора є встановлення конкретного механізму інактивації ферменту та розробка процедури, що повністю запобігає даному процесу.

Одним із методів, що використовують для покращення стабільності ферментів, є прямий сайт-специфічний мутагенез, який викликає зростання ліпофільності ферменту або переміщення його каталітичних груп у сайти, більш захищені від впливу оточуючого мікросередовища [9]. Очевидно, що подібний підхід є досить трудомістким та тривалим і не завжди можливий для певного ферменту.

Іншим способом покращення стабільності біосенсорів є застосування при їх розробці стабілізуювальних домішок, у ролі яких можуть виступати поліелектроліти, осмоліти, спирти, білки-шапероніни, цукри, солі або наночастки із золота,

оксиду цинку чи оксиду заліза (Fe_3O_4) [9–12]. Показано, що такі домішки, вступаючи в електростатичні взаємодії з ферментом, а інколи навіть утворюючи навколо нього оболонку, здатні змінити його конформацію та спричинити підвищення його стабільності [9]. Подібні стабілізатори можна або вводити як компонент чутливої мембрани при іммобілізації ферменту, або додавати у робочий буфер при проведенні вимірювання та зберіганні датчиків. Застосування стабілізуючих речовин виглядає ефективним способом збереження активності ферменту, проте сама процедура підбору оптимального комплексу стабілізаторів для конкретного ферменту, іммобілізованого певним методом, є досить тривалою. Крім того, розробка біосенсора з використанням складної, багата стадійної процедури іммобілізації ферменту разом із стабілізаторами інколи знижує відтворюваність відгуків від сенсора до сенсора, а додавання домішок деяких солей може призвести до зворотного результату – дестабілізації ферменту [9]. Внесення стабілізуючих домішок у робочий розчин при аналізі реальних рідин ускладнює аналітичну процедуру та, ймовірно, чинить інтерферуючий вплив на роботу біосенсора.

Виходячи з літературних даних, найвагомішою причиною суттєвого падіння активності ЛОД, іммобілізованої у чутливу мембрану, є часткова денатурація ферменту під впливом пероксиду водню, що утворюється під час реакції розщеплення лактату і окиснює амінокислоти каталітичного центра [8, 11]. Тому альтернативним способом підвищення стабільності лактатного датчика є застосування для його розробки не ЛОД, а іншого альтернативного безкофакторного ферменту, робота якого не була б пов'язана з утворенням пероксиду водню.

У ролі біорозпізнавального елемента лактатного біосенсора може виступити L-лактат-цитохром *c*-оксидоредуктаза (КФ 1.1.2.3; флавоцитохром b_2 , ФЦ b_2), яка каталізує *in vivo* перенесення електронів з L-лактату на цитохром *c* у мітохондріях дріжджів. ФЦ b_2 можна виділяти з дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala* або *H. polymorpha* у вигляді гомотетрамеру, кожна субодиниця якого містить по одній молекулі флавінмононуклеотиду і протопегму IX [13]. ФЦ b_2 функціонує *in vitro* як се-

лективний фермент відносно донора електронів (L-лактату) і водночас є неспецифічним до природи синтетичних акцепторів електронів, що робить його перспективним в аналітичній біотехнології для визначення вмісту L-лактату. Як свідчать дослідження, проведені з ФЦ b_2 термотолерантних дріжджів *H. polymorpha*, цей фермент демонструє трохи кращу, ніж ЛОД, стабільність при зберіганні (на 5-ту добу після іммобілізації залишається половина активності ферменту) та операційну стабільність (реєструється 50 % від початкового сигналу після 6 год безперервної роботи) [14].

Вивчення селективності біосенсора на основі ФЦ b_2 показало, що цей фермент не дає неспецифічних відгуків на малат, піруват, ацетат та ізоцитрат [13, 14]. При цьому основними компонентами вина, представленими в ньому у найвищій мірі, є етанол і глюкоза, які разом з аскорбіновою кислотою та фенольними речовинами часто суттєво заважають кількісному визначенню лактату у винах і виноматеріалах [2]. Тому найбільший інтерес при розробці лактатного біосенсора для аналізу винопродуктів становить дослідження його селективності саме щодо цих інтерферуючих речовин.

Відповідно мета даної роботи полягала в розробці L-лактатного амперометричного біосенсора з використанням флавоцитохрому b_2 , виділеного з клітин *H. polymorpha*, та дослідженні можливих переваг і недоліків його застосування для аналізу вина у порівнянні з датчиком на основі іммобілізованої лактатоксидази.

Матеріали і методи. У роботі використано три різних препарати ферменту ФЦ b_2 , виділені з клітин дикого штаму *H. polymorpha* 356 лінії DL1. Препарат № 1 стабілізували у 40 %-му сульфаті амонію (СА), його питома активність становила 3 од/мг, концентрація білка – 4,8 мг/мл. Препарат № 2 у 80 %-му СА мав питому активність 1,44 од/мг, концентрацію білка – 4,5 мг/мл. Питома активність частково очищеного препарату № 3 становила 0,75 од/мг, концентрація білка – 13,9 мг/мл, препарат містив домішки акогольоксидази (0,2 мг/мл).

У разі препаратів № 1 і № 2 проводили двостадійне очищення (хроматографію і рехроматографію). Метою першої хроматографії було позбутися домішок алкогольоксидази, її виконували

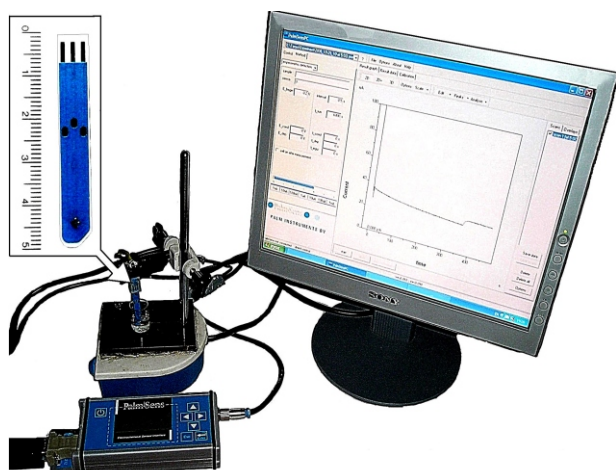


Рис. 1. Зовнішній вигляд амперометричної установки на основі потенціостата PalmSens

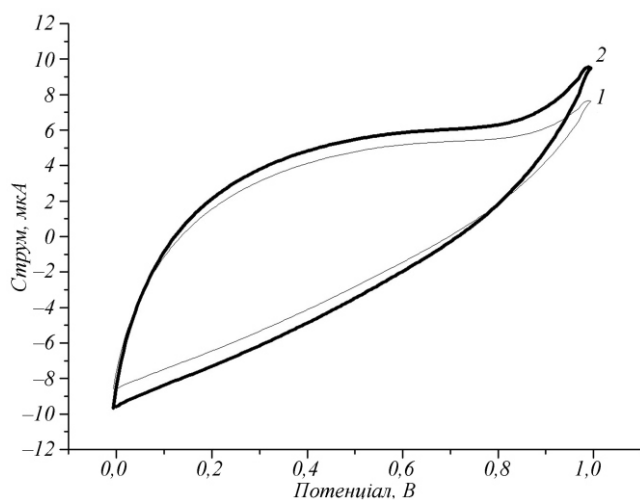


Рис. 2. Циклічна вольтамперограма, отримана на промислових платинових друкованих електродах SensLab з іммобілізованим ФЦ b_2 у фосфатному буфері (1) та при додаванні 2 мМ фериціаніду калію та 1 мМ L-лактату (2)

відповідно до [15]. Рехроматографію здійснювали, як у роботі [14], для очищення і концентрування ФЦ b_2 . Проведення двостадійної хроматографії забезпечувало гомогенність препарату ФЦ b_2 .

Концентрацію білка визначали методом Лоурі, який ґрунтується на утворенні забарвлених продуктів реакції ароматичних амінокислот з реактивом Фоліна у поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки. Калібрувальним стандартом слугував бичачий сироватковий альбумін (БСА).

Як матрицю для електрохімічної полімеризації ферменту використовували мономер 3,4-ети-

лендіокситіофен (ЕДТ) виробництва фірми «Baytron M» (Німеччина) та поліетиленгліколь ММ = 1450 («Sigma», Швейцарія).

Також у роботі використано $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaCl , L-лактат натрію та фериціанід калію виробництва фірми «Sigma» (США), пероксид водню («Фаргомед», Україна), глюкозу, L-аскорбінову кислоту та БСА («Sigma-Aldrich Chimie S. V. a. l.», Франція), етанол («Fluka», Німеччина), глутаровий альдегід («Fluka», Швейцарія) та гліцерин (Україна). Усі реактиви як вітчизняного, так і імпортового виробництва були кваліфікації «ос. ч» і «х. ч».

Вимірювання. Електрохімічні експерименти виконано в амперометричному режимі за допомогою традиційної триелектродної системи, у якій друкований електрод SensLab («SensLab GmbH», Німеччина) об'єднав у собі три електроди: платиновий робочий, допоміжний та електрод порівняння.

Платинові друковані електроди SensLab досліджували на відтворюваність та працездатність у діапазоні потенціалу від 0 до +1000 мВ (швидкість розгортання потенціалу 20 мВ/с). Циклічну вольтамперометрію здійснювали на потенціостаті PalmSens («Palm Instruments BV», Нідерланди). На рис. 1 представлено зовнішній вигляд амперометричної установки, використаної у роботі, яка складається з потенціостата PalmSens, електрохімічної комірки та комп'ютера.

На рис. 2 наведено циклічну вольтамперограму, отриману на платиновому електроді SensLab з іммобілізованим ФЦ b_2 у робочому буфері та при додаванні 2 мМ фериціаніду калію та 1 мМ L-лактату. Як видно з цього рисунка, при внесенні до робочої комірки субстрату ферменту та медіатора спостерігається поява окиснювального (анодного) струму та підвищення сигналу датчика. Потенціал +450 мВ обрано нами як робочий, оскільки саме на це значення припадає редокс-потенціал фериціаніду калію [16].

Амперометричне вимірювання при постійному потенціалі проводили в електрохімічній комірці об'ємом 5 мл за допомогою потенціостата PalmSens.

Іммобілізація ФЦ b_2 методом електрохімічної полімеризації у полі-3,4-етилендіокситіофені. Процес іммобілізації ферментів електрохімічною

полімеризацією детально описаний у роботі [2]. Для електрохімічної полімеризації використовували суміш компонентів, приготовлених у 20 мМ фосфатному буфері з рН 6,2, до складу якої входили 10 мМ ЕДТ, 1 мМ поліетиленгліколь та 3 мкл розчину ФЦ b_2 .

Електрополімеризацію ЕДТ здійснювали, прикладаючи потенціал від +0,2 до +1,5 В із швидкістю 0,1 В/с протягом 15 циклів.

Імобілізація ФЦ b_2 у парах глутарового альдегіду (ГА). Для утворення біоселективних мембран готували суміш 3 мкл розчину ФЦ b_2 та 5 % БСА (1:3) в 10 мМ фосфатному буфері, рН 7,2. Суміш ФЦ b_2 -БСА наносили на робочу поверхню електрода. Для полімеризації мембран датчики поміщали в атмосферу насичених парів ГА на 10 хв, після чого підсушували на повітрі.

Визначення L-лактату у модельних розчинах. Вимірювання проводили при кімнатній температурі у відкритому об'ємі за інтенсивного перемішування. Як робочий використано 20 мМ буферний розчин KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 з рН 7,6. Медіатором служував 2 мМ фериціанід калію; фоновим електролітом – NaCl (10–100 мМ).

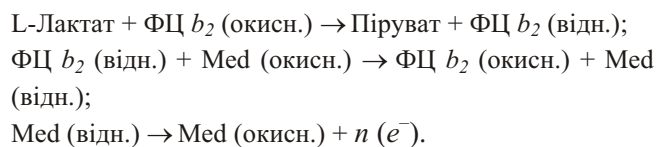
Концентрації аналітів змінювали, додаючи певні аліквоти концентрованих стандартних розчинів. Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали буферним розчином до стабілізації базового сигналу.

Дослідження операційної стабільності та стабільності біосенсорів при зберіганні. Для визначення операційної стабільності біосенсорів до електрохімічної комірки періодично вносили аліквоти субстрату (3,2 мМ для датчиків на основі ФЦ b_2 № 1 і № 2 та 0,032 мМ для датчика на основі ФЦ b_2 № 3) і реєстрували зміну сигналу біосенсора на L-лактат протягом 8 год неперервної роботи.

Електроди з іммобілізованим у парах ГА та в полі-3,4-етилendioкситіофені (ПЕДТ) ФЦ b_2 зберігали у сухому стані за температури 4 °С. У ході аналізу стабільності біосенсорів при зберіганні досліджували зміну величини їхнього відгуку на ту саму аліквоту субстрату, що й при визначенні операційної стабільності.

Результати і обговорення. Робота амперометричних біосенсорів, створених на основі ФЦ b_2 , ба-

зується на такій ферментативній реакції із застосуванням медіатора (Med) [3]:



Електрони, які утворюються в результаті наведених реакцій і густина яких є пропорційною концентрації L-лактату в електрохімічній комірці, реєструються амперометричним перетворювачем.

На першому етапі роботи для іммобілізації ФЦ b_2 використано метод іммобілізації у парах глутарового альдегіду в БСА-вмісній мембрані. При розробці лактатного датчика створено лабораторні прототипи амперометричних біосенсорів на основі трьох різних за активністю і ступенем очищення препаратів ФЦ b_2 для вибору з них оптимального. Однак препарати ФЦ b_2 № 1 і № 2 після іммобілізації у парах ГА виявилися неактивними і не давали сигналу на L-лактат.

Біосенсор на основі препарату ФЦ b_2 № 3, іммобілізованого в ГА, демонстрував невеликі (до 12 нА) відгуки на L-лактат і характеризувався динамічним діапазоном роботи у межах концентрації субстрату 0,002–0,032 мМ. Дослідження селективності розробленого датчика виявило, що даний біосенсор практично не реагує на глюкозу, а на інші потенційно інтерферуючі компоненти вина дає істотні неспецифічні відгуки, причому на аскорбінову кислоту – негативні. Враховуючи те, що інтерферуючі речовини в експерименті були взяті у концентраціях, максимально можливих у вині [1], а L-лактат – у концентрації, на яку припадає насичення розробленого біосенсора, можна констатувати, що селективність датчика на основі препарату № 3 ФЦ b_2 , іммобілізованого у парах ГА, є незадовільною, сам датчик є непридатним для аналізу L-лактату у вині та виноматеріалі.

Також вивчено стабільність біосенсора на основі препарату № 3 ФЦ b_2 в ГА при зберіганні та показано, що через одну добу після іммобілізації ферменту даний датчик демонструє 18 % від вихідної активності. За даними аналізу операційної стабільності біосенсора визначено, що він по-

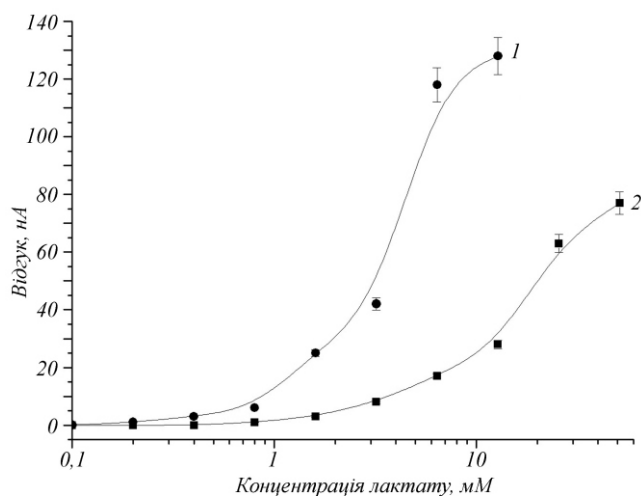


Рис. 3. Калібрувальні криві лабораторних прототипів амперометричних біосенсорів, отриманих шляхом електрохімічної полімеризації в полі-3,4-етилендіокситіофені ФЦ b_2 : 1 – препарату № 1; 2 – препарату № 2. Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,6, при потенціалі +450 мВ відносно електрода порівняння

вністю втрачає початкову активність через 1 год безперервної роботи.

Таким чином, результати експериментів з лактатними амперометричними біосенсорами, розробленими із застосуванням методу іммобілізації ФЦ b_2 в парах глутарового альдегіду, виявилися незадовільними, і нами було досліджено інший метод іммобілізації ФЦ b_2 , а саме – електрохімічну полімеризацію в ПЕДТ.

Усі три препарати ФЦ b_2 , іммобілізовані з використанням даної методики, виявилися активними. Калібрувальні криві лабораторних прототипів амперометричних біосенсорів, створених на основі препаратів ФЦ b_2 № 1 і 2, іммобілізованих у ПЕДТ, представлено на рис. 3. Сенсор на основі препарату ФЦ b_2 № 3 демонстрував дуже низькі (до 11 нА) відгуки на L-лактат і характеризувався діапазоном роботи у межах 0,001–0,06 мМ субстрату.

Для вибору найефективнішого для розробки L-лактатного амперометричного біосенсора препарату ФЦ b_2 проведено порівняльний аналіз розроблених датчиків, у ході якого досліджували їхні динамічні діапазони роботи, граничні концентрації L-лактату, що визначаються сенсорами, їхня операційна стабільність, стабільність при зберіганні та селективність.

Як встановлено, біосенсор з іммобілізованим у ПЕДТ препаратом ФЦ b_2 № 3 демонструє значно нижчу за інші датчики межу визначення лактату (1 мкМ), проте динамічний діапазон його роботи є вузьким, а рівень сигналу не перевищує 11 нА, що, безперечно, обмежує застосування біосенсора на основі даного препарату ФЦ b_2 для аналізу лактату у реальних рідинах. Датчики на основі ФЦ b_2 № 1 і № 2 характеризуються широкими динамічними діапазонами роботи (0,2–6,4 та 0,8–25,6 мМ лактату відповідно) та величиною корисного сигналу до 70–130 нА. Тобто за даними показниками препарати ФЦ b_2 № 1 і № 2 виглядають більш оптимальними для використання при розробці L-лактатного амперометричного біосенсора. Тим часом гранична концентрація аналіту, визначена біосенсорами з ФЦ b_2 № 1 і № 2, є досить високою (0,2–0,8 мМ), що може викликати труднощі при аналізі вин із низьким вмістом L-лактату.

Результати дослідження операційної стабільності амперометричних біосенсорів з іммобілізованими у ПЕДТ трьома препаратами ФЦ b_2 представлено на рис. 4, а. Як видно з цих даних, датчик на основі препарату № 1 у перші години безперервної роботи різко втрачає майже 40 % вихідної активності, проте надалі величина його сигналу залишається практично незмінною. Відповідно відтворюваність відгуків даного біосенсора є високою. Таке швидке падіння активності біосенсора протягом перших годин роботи можна пояснити відокремленням від поверхні електрода неміцно приєднаних частин чутливої мембрани та/або вимиванням у розчин недостатньо надійно іммобілізованих молекул ферменту [8].

Операційна стабільність датчика на основі препарату № 2 є гіршою, його активність протягом безперервної роботи постійно знижується, що спричиняє слабку відтворюваність сигналів. Операційна стабільність біосенсора з ФЦ b_2 № 3, який повністю втрачає початкову активність за 3 год, є незадовільною.

Стабільність при зберіганні, як свідчать дані рис. 4, б, у біосенсора на основі ФЦ b_2 № 3 також є надзвичайно низькою – його активність повністю втрачається за 5 днів зберігання. Стабільність двох інших датчиків є вищою, вони демонструють

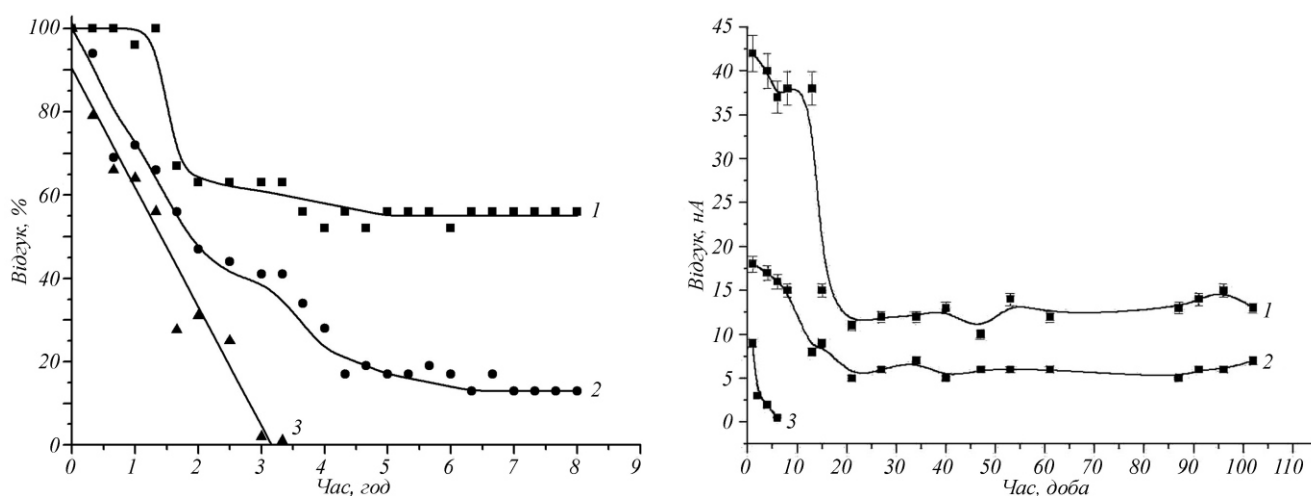


Рис. 4. Операційна стабільність (а) та зміна величини відгуку при зберіганні (б) амперометричних біосенсорів на основі іммобілізованого в полі-3,4-етилендіокситіофені ФЦ b_2 : 1 – препарату № 1; 2 – препарату № 2; 3 – препарату № 3. Концентрація L-лактату, доданого до комірки, становить 3,2 мМ для біосенсорів на основі ФЦ b_2 № 1 і № 2 та 0,032 мМ для біосенсора на основі ФЦ b_2 № 3. Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,6, при потенціалі +450 мВ відносно електрода порівняння

Таблиця 1

Величина відгуків лабораторних прототипів амперометричних біосенсорів, створених на основі різних препаратів ФЦ b_2 , на L-лактат (при насиченні) та основні інтерферуючі речовини вина

Препарат ФЦ b_2 №	Величина відгуку, нА				
	Лактат	Етанол, 15 мМ	Гліцерол, 1 мМ	Глюкоза, 5 мМ	Аскорбінова кислота, 0,13 мМ
1	118	150	10	0,5	-3
2	63	53	7	3	0,5
3	11	40	9	7	-31

більше 35 % від початкового сигналу через 100 днів зберігання.

На наступному етапі роботи досліджували селективність амперометричних біосенсорів, створених на основі трьох різних препаратів ФЦ b_2 . Отримано відгуки біосенсорів на внесення в електродну комірку L-лактату у кількості, що відповідає верхній межі динамічного діапазону кожного датчика, та основних інтерферуючих речовин вина (етанолу, гліцеролу, глюкози та аскорбінової кислоти) у максимальних концентраціях, що можуть бути в ньому присутніми. Результати аналізу селективності розроблених біосенсорів представлено в табл. 1.

Як видно з цієї таблиці, препарат ферменту № 3 демонструє найнижчу селективність і дає, як і при іммобілізації у парах ГА, істотні неспецифічні відгуки на основні інтерферуючі речовини вина

(позитивні сигнали на етанол, гліцерол та глюкозу і негативні – на аскорбінову кислоту), які навіть перевищують величину лактатного сигналу. Це можна пояснити недосконалою схемою очищення даного препарату ФЦ b_2 . Селективність інших двох препаратів є кращою, вони майже не реагують на аскорбінову кислоту, глюкозу та гліцерол, однак дають відгук на етанол, практично рівний відгуку на L-лактат.

Порівняльну характеристику амперометричних біосенсорів, створених на основі трьох різних препаратів ФЦ b_2 , іммобілізованих у ПЕДТ, а також біосенсора з іммобілізованою у зазначеному полімері ЛОД, розробленого нами раніше [2], наведено у табл. 2.

Таким чином, виходячи з отриманих результатів, препарат ФЦ b_2 № 1 було обрано серед трьох препаратів як найоптимальніший для розробки

Таблиця 2

Порівняльний аналіз лабораторних прототипів амперометричних біосенсорів, створених на основі різних препаратів ФЦ b_2 , та біосенсора на основі лактатоксидази

Фермент і його активність	Мінімум детекції, мМ	Динамічний діапазон роботи сенсора, мМ	Операційна стабільність (%) біосенсора при безперервній роботі протягом			Залишкова активність сенсора при зберіганні, %		
			1 год	3 год	8 год	Через 1 добу	Через 5 діб	Через 100 діб
ФЦ b_2 № 1 (14,4 од/мл)	0,2	0,2–6,4	96	63	56	100	93	36
ФЦ b_2 № 2 (6,5 од/мл)	0,8	0,8–25,6	72	41	13	94	89	38
ФЦ b_2 № 3 (10,4 од/мл; домішки алкогольоксидази)	0,001	0,001–0,064	64	2	0	30	10	–
Лактатоксидаза (39 од/мг)	0,008	0,008–1	89	33	25	30	18	–

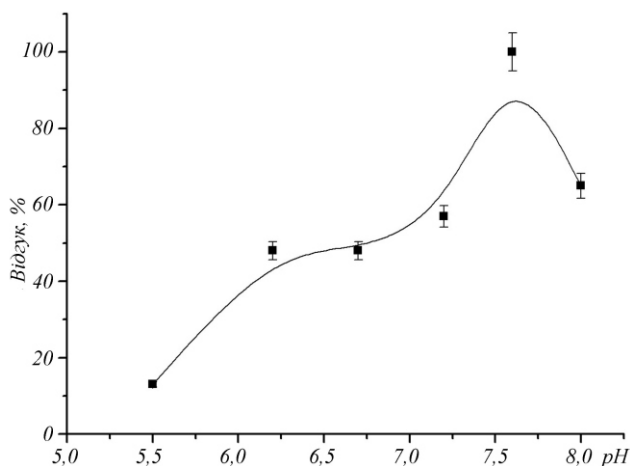


Рис. 5. Залежність величини відгуку амперометричного біосенсора на основі ФЦ b_2 (препарат № 1), іммобілізованого в полі-3,4-етилендіокситіофені, від рН робочого розчину. Концентрація L-лактату, внесеного до комірки, становить 6,4 мМ. Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері при потенціалі +450 мВ відносно електрода порівняння

L-лактатного амперометричного біосенсора за показниками величини динамічного діапазону і стабільності. Операційна стабільність та стабільність при зберіганні датчика на основі препарату ФЦ b_2 № 1 є кращою порівняно з біосенсором, створеним на основі ЛОД. Однак застосування даного датчика з іммобілізованим ФЦ b_2 № 1 для аналізу вина виявилось неефективним: через низьку селективність біосенсора результати вимірювань перевищували дійсні значення концентрації L-лактату у винах в декілька разів.

При цьому селективність амперометричного біосенсора, розробленого нами на основі іммобілізованої ЛОД, була високою: датчик демонстрував незначний неспецифічний відгук на етанол лише у високих концентраціях, які не можуть бути присутніми у вині [2]. Наявність істотних неспецифічних сигналів у біосенсорів з іммобілізованим ФЦ b_2 можна пояснити недостатньою селективністю даних датчиків або тим, що при відносно високому потенціалі +450 мВ, використаному при роботі з ФЦ b_2 та фериціанідом калію, відбувається автоокиснення інтерферуючих речовин і відповідно поява амперометричного відгуку на них. У разі ж датчика на основі ЛОД як робочий застосовано потенціал +200 мВ, при якому вплив інтерферуючих речовин на функціонування біосенсора значно знижувався.

На останньому етапі дослідження визначали рН-оптимум роботи біосенсора на основі препарату ФЦ b_2 № 1, який становив 7,6 (рис. 5). Цей результат добре корелює з попередньо отриманими даними [14].

Крім того, показано, що величина відгуку L-лактатного амперометричного біосенсора на основі препарату ФЦ b_2 № 1 практично не залежить від величини буферної ємності та іонної сили робочого розчину (рис. 6, а, б), що є типовим для амперометричних біосенсорів, у тому числі і для лактатного датчика на основі ЛОД [17].

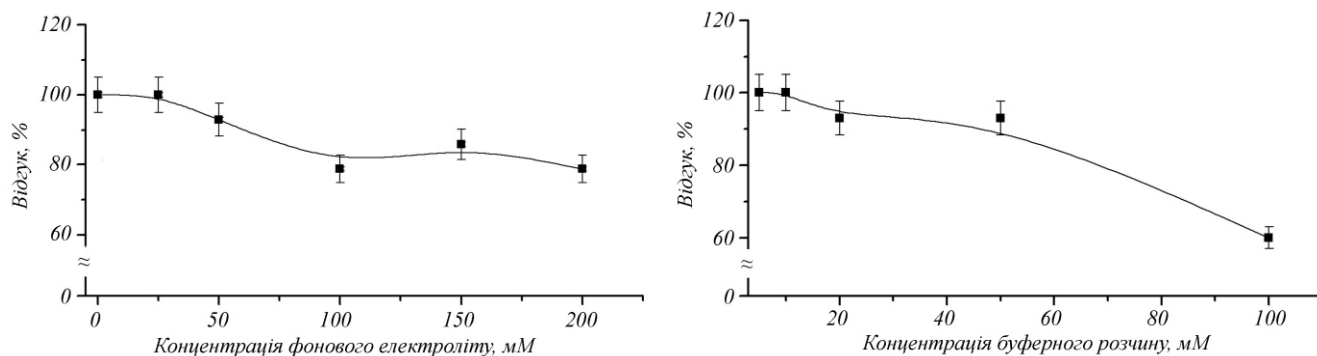


Рис. 6. Залежність величини відгуку амперометричного біосенсора на основі ФЦ b_2 (препарат № 1), іммобілізованого в полі-3,4-етилендіокситіофені, від концентрації фонового електроліту в буфері (а) та від концентрації буферного розчину (б). Концентрація лактату, внесеного до комірки, становить 6,4 мМ. Вимірювання проводили у фосфатному буфері, рН 7,6, при потенціалі +450 мВ відносно електрода порівняння

Таким чином, у результаті дослідження встановлено, що при розробці амперометричного L-лактатного біосенсора на основі флавоцитохрому b_2 найефективнішим є застосування препарату ФЦ b_2 № 1 (питома активність 3 од/мг, концентрація білка 4,8 мг/мл), іммобілізованого методом електрохімічної полімеризації у ПЕДТ. Створений на основі даного препарату біосенсор демонструє кращу операційну стабільність і стабільність при зберіганні у порівнянні з датчиком на основі іммобілізованої в ПЕДТ лактатоксидази. Проте за показниками чутливості та, особливо, селективності при використанні у роботі потенціалах лактатний біосенсор на основі ЛОД значно перевершує свій аналог з іммобілізованим ФЦ b_2 , а саме ці параметри є вирішальними при виборі інструменту для аналізу вина і суслу – складних сумішей, концентрація L-лактату у яких часто є досить низькою. Тестуванням біосенсора на основі ЛОД доведено ефективність при його застосуванні для визначення вмісту лактату у зразках вина, тоді як результати, отримані за допомогою датчика з іммобілізованим ФЦ b_2 , виявилися гіршими. Саме тому використання лактатного біосенсора на основі ЛОД у виноробстві бачиться перспективнішим. У той же час біосенсор на основі ФЦ b_2 , перевагою якого є краща стабільність, можна застосовувати для аналізу інших рідин, наприклад, крові, яка не містить етанолу, а концентрація L-лактату у ній є відносно високою (0,5–2,2 мМ [8]) і добре вкладається в межі динамічного діапазону розробленого датчика. Крім

того, як показує попередній досвід [13], при застосуванні нижчого робочого потенціалу, зокрема, у присутності медіаторів з низьким редокс-потенціалом та при використанні препаратів ФЦ b_2 з вищою об'ємною активністю, можна досягти суттєвого покращення як селективності, так і чутливості біосенсора на основі ФЦ b_2 . Тому ми плануємо продовжити дослідження у цьому напрямку.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технічних потреб» та проекту УНТЦ № 4378 «Генетична і білкова інженерія оксидоредуктаз з метою конструювання біонанорозмірних об'єктів аналітичного призначення».

T. B. Goriushkina, A. P. Orlova, O. V. Smutok, M. V. Gonchar, A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych

Application of L-lactate-cytochrome c-oxidoreductase for development of amperometric biosensor for L-lactate determination

Summary

Aim. Development of amperometric biosensor based on L-lactate-cytochrome c-oxidoreductase (flavocytochrome b_2 , FC b_2) for lactate determination. **Methods.** All experiments were performed using the amperometric method of detection. The methods of electrochemical polymerization and immobilization in glutaraldehyde vapors were used for FC b_2 immobilization on the surface of electrodes. **Results.** The FC b_2 preparation, which demonstrated the best operational characteristics after immobilization in poly (3,4-ethylenedioxythiophene), was selected. The selectivity, operational and storage stability, and pH-optimum for operation of the created biosensor were determined. The analysis of L-lactate in the model solutions and wine samples was carried out

using the developed biosensor. **Conclusion.** The FC b_2 -based biosensor due to its high stability can be effectively used for lactate determination in blood and other liquids containing no ethanol. After the selectivity optimization, the device can be also applied for wine analysis.

Keywords: amperometric biosensor, flavocytochrome b_2 , L-lactate.

Т. Б. Горюшкіна, А. П. Орлова, О. В. Смуток, М. В. Гончар, А. П. Солдаткин, С. В. Дзядевич

Использование L-лактат-цитохром с-оксидоредуктазы при создании амперометрического биосенсора для определения L-лактата

Резюме

Цель. Разработать амперометрический биосенсор для определения L-лактата на основе L-лактат-цитохром с-оксидоредуктазы (флавоцитохрома b_2 , ФЦ b_2) дрожжей *Hansenula polymorpha*. **Методы.** Все эксперименты проводили с использованием амперометрического метода измерения. Для иммобилизации ФЦ b_2 на поверхность электродов применяли методы электрохимической полимеризации и иммобилизации в парах глутарового альдегида. **Результаты.** Выбран препарат фермента ФЦ b_2 , демонстрирующий после иммобилизации в поли-3,4-этилендиокситиофене наилучшие рабочие характеристики. Исследованы селективность, операционная стабильность и стабильность при хранении созданного биосенсора, установлен рН-оптимум его работы. С помощью разработанного высокостабильного биосенсора проведен анализ концентрации L-лактата в модельных растворах и образцах вина. **Выводы.** Биосенсор на основе ФЦ b_2 , преимуществом которого является высокая стабильность, можно эффективно использовать для анализов крови и других жидкостей, не содержащих этанол, а после оптимизации его селективности – и для анализа вина.

Ключевые слова: амперометрический биосенсор, флавоцитохром b_2 , L-лактат.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Goriushkina T. B., Dzyadevych S. V. Grape wines: chemical composition and methods of determination (in Ukrainian) // Biotekhnology.–2008.– 1, N 2.–P. 24–38.
- Goriushkina T. B., Shkotova L. V., Slast'ya E. A., Soldatkin A. P., Dzyadevych S. V. Optimization of methods of lactate determination in wine by amperometric enzyme biosensor (in Ukrainian) // Sensor Electronics and Microsystem Technologies.–2008.–N 2.–P. 39–47.
- Goriushkina T. B., Dzyadevych S. V. Enzymatic biosensors for quantitative analysis of wine's components (in Ukrainian) // Sensor Electronics and Microsystem Technologies.–2008.–N 1.–P. 49–67.
- Rahman M. M., Shiddiky M. J. A., Rahman M. A., Shim Y.-B. A lactate biosensor based on LDH/NADH immobilized on a conducting polymer/multiwall carbon nanotube composite film // Anal. Biochem.–2009.–384.–P. 159–165.
- Mazzei F., BotrP F., Favero G. Peroxidase based biosensors for the selective determination of D, L-lactic acid and L-malic acid in wines // Microchem. J.–2007.–87.–P. 81–86.
- Esti M., Volpe G., Micheli L., Delibato E., Compagnone D., Moscone D., Palleschi G. Electrochemical biosensors for monitoring malolactic fermentation in red wine using two strains of *Oenococcus oeni* // Anal. Chim. Acta.–2004.–513, N 1.–P. 357–364.
- Parra A., Casero E., Vazquez L., Pariente F., Lorenzo E. Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces // Anal. Chim. Acta.–2006.–555.–P. 308–315.
- Rhemrev-Boom M. M., Jonker M. A., Venema K., Jobst G., Tiessena R., Korf J. On-line continuous monitoring of glucose or lactate by ultraslow microdialysis combined with a flow-through nanoliter biosensor based on poly(m-phenylenediamine) ultra-thin polymer membrane as enzyme electrode // Analyst.–2001.–126.–P. 1073–1079.
- Chaniotakis N. A. Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor applications // Anal. Bioanal. Chem.–2004.–378.–P. 89–95.
- Gibson T. D., Hulbert J. N., Woodward J. R. Preservation of shelf life of enzyme based analytical systems using a combination of sugars, sugar alcohols and cationic polymers or zinc ions // Anal. Chim. Acta.–1993.–279.–P. 185–192.
- Azevedo A. M., Cabral J. M. S., Prazeres D. M. F., Gibson T. D., Fonseca L. P. Thermal and operational stabilities of *Hansenula polymorpha* alcohol oxidase // J. Mol. Catalysis B: Enzymatic.–2004.–27.–P. 37–45.
- Kaushik A., Khan R., Solanki P. R., Pandey P., Alam J., Ahmad S., Malhotra B. D. Iron oxide nanoparticles–chitosan composite based glucose biosensor // Biosensors and Bioelectronics.–2008.–24.–P. 676–683.
- Smutok O., Gayda G., Gonchar M., Schuhmann W. A novel L-lactate-selective biosensor based on flavocytochrome b_2 from methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // Biosensors and Bioelectronics.–2005.–20.–P. 1285–1290.
- Smutok O. V., Gayda G. Z., Shuman V., Gonchar M. V. Development of L-lactate-selective biosensor based on thermo-stable yeast L-lactate-cytochrome c-oxidoreductase // Investigation on Sensor Systems and Technologies / Eds A. V. El'skaya, V. D. Pokhodenko).–Kyiv: IMBG, 2006.–P. 51–57.
- Shleev S. V., Shumakovich G. P., Nikitina O. V., Morozova O. V., Pavlishko H. M., Gayda G. Z., Gonchar M. V. Purification and characterization of alcohol oxidase from a genetically constructed over-producing strain of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // Biochemistry.–2006.–71, N 3.–P. 245–250.
- Dzyadevych S. V., Soldatkin A. P. Solid-state electrochemical enzyme biosensors.–Kyiv: IMBG, 2008.–222 p.
- Shkotova L. V., Goriushkina T. B., Slast'ya E. A., Soldatkin A. P., Tranh-Minh C., Chovelon J.-M., Dzyadevych S. V. Amperometric biosensor for lactate analysis in wines and must during wine fermentation (in Ukrainian) // Ukr. Biochem. Jurnal.–2005.–77, N 5.–C. 123–130.

УДК 577.15 + 573.6
Надійшла до редакції 15.01.09