

НОВІ МЕТОДИ

УДК 577.15.543.555

ФЕРМЕНТНИЙ КОНДУКТОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЛАКТОЗИ

Пешкова В. М.^{1,2}
Саяпіна О. Я.^{1,3}
Солдаткін О. О.¹
Кукла О. Л.⁴
Дзядевич С. В.¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ
²Київський національний університет імені Тараса Шевченка
³Національний університет харчових технологій, Київ
⁴Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова
НАН України, Київ

E-mail: victoir@ukr.net

Розроблено ферментний кондуктометричний біосенсор для визначення лактози. Роль біочутливого елемента виконує триферментна мембрана (глюкозооксидаза, мутаротаза, β -галактозидаза), що іммобілізована на поверхню кондуктометричного перетворювача. Досліджено робочі характеристики біосенсора. Час визначення концентрації лактози в розчині становив 1–2 хв, лінійний діапазон роботи біосенсора — від 0,01 мМ до 0,75 мМ для глюкози та від 0,01 мМ до 1,25 мМ для лактози. Встановлено залежність величини відгуку біосенсора на внесення субстрату від рН, іонної сили та буферної ємності робочого розчину, наведено дані щодо селективності біосенсора та його стабільності під час зберігання. Розроблений кондуктометричний біосенсор характеризується високою операційною стабільністю та відтворюваністю сигналу.

Ключові слова: кондуктометричний ферментний біосенсор, лактоза, глюкоза, глюкозооксидаза, мутаротаза, β -галактозидаза.

Унікальні властивості лактози зумовлюють широке застосування її у мікробіології, аналітичній хімії, харчовій промисловості, фармакології тощо. Зараз лактозу інтенсивно використовують у виробництві дитячого харчування та замінників жіночого молока. Також її широко застосовують у виробництві медичних препаратів, антибіотиків та харчових продуктів. У процесі виготовлення медичних препаратів рафінований молочний цукор використовують як інертний наповнювач, розріджувач або активний компонент. У свою чергу, сирець чи кристаліза́т молочного цукру (45% лактози) є одним із головних компонентів середовищ для ферментації у виробництві антибіотиків. Очищений (харчовий) молочний цукор використовується у харчовій промисловості для виготовлення різних видів карамелі, шоколаду, джемів, мармеладу, бісквітів, цукерок, глазури, діабетичних продуктів, м'ясних виробів тощо. У хлібопекарській промисловості лактозу застосовують для збільшення об'єму хліба та здобних виробів. Виявлено, що лактоза стабілізує та покращує колір, смак і запах різних конди-



терських виробів. Завдяки цим властивостям її використовують у виробництві смакових та ароматичних добавок. Помічено, що додавання лактози у м'ясні продукти маскує їхній солоний та гіркий присмак, поліпшує стабільність продукту під час зберігання. Часткова заміна сахарози на лактозу зменшує солодкість і особливо посилює смак фруктів та ягід у джемах і мармеладах. Використання лактози у виробництві алкогольних напоїв підсилює та одночасно пом'якшує їхній смак.

В організмі лактоза сприяє всмоктуванню кальцію, магнію, марганцю, має біфідогенні властивості (підтримує ріст біфідобактерій), також інгібує ріст патогенної мікрофлори кишечника.

Для кисломолочних бактерій лактоза є основним джерелом енергії, що спричинює молочнокисле бродіння, унаслідок якого отримують багато кисломолочних продуктів. Також у молочноконсервному виробництві лактозу використовують як затравку для кристалізації у виробництві згущеного молока.

Вихід та якість молочних продуктів, що визначаються складом молока, концентрацією, структурою і властивостями його компонентів, перебувають у прямій залежності від зоотехнічних факторів та стану тварин (кормовий раціон, здоров'я тварин, лактаційний період тощо). У свою чергу, вміст лактози, що є одним з основних компонентів молока та молочних продуктів, — важливий показник якості молочних продуктів. До того ж на сьогодні у багатьох людей є лактозна недостатність (вроджений чи набутий стан, що характеризується зниженням рівня ферменту лактази, яка розщеплює лактозу до глюкози та галактози). Клінічним виявом цієї хвороби є інтолерантність до лактози [1].



У зв'язку з усім вищезазначеним цілком очевидно, що на сьогодні існує потреба в добре налагодженій системі моніторингу концентрації лактози, передусім у складі молочних продуктів на молочному виробництві, а також у багатьох інших галузях (медичне, харчове виробництво). Більш того, визначення лактози може знадобитися в ензимології та мікробіології для більш детального вивчення процесів ферментації, молочнокислого бродіння тощо. Сучасні стандартні методи високоточного визначення лактози потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання, яке є необхідним для рідинної, газової хроматографії, хімічних, гравіметричних та оптичних методів [2]. Ще одним недоліком наведених вище методів є необхідність у досить складній попередній підготовці проб для аналізу. Інші методи, такі як поляриметрия та рефрактометрия, є простими і швидкими, але менш точними та селективними. На противагу їм біосенсори є більш зручними, точними, селективними, швидкими та дешевими приладами. Створення біосенсора для визначення лактози може спростити та поліпшити систему моніторингу вмісту лактози в молочних продуктах та медичних препаратах.

На сьогодні існує низка лабораторних прототипів біосенсорів для визначення лак-

този [3–16]. Більшість із них є амперометричними з різними іммобілізованими на поверхню електродів ферментами: β -галактозидаза та галактозооксидаза [3], β -галактозидаза та глюкозооксидаза (ГОД) [2, 4–7], пероксидаза хрину, глюкозооксидаза та β -галактозидаза [8], β -галактозидаза, мутаротаза та глюкозодегідрогеназа [9], β -галактозидаза, галактозодегідрогеназа [10–12], целобіозодегідрогеназа [13].

Деякі автори також повідомляють про розроблення біосенсорів для визначення лактози з використанням різних медіаторів [8, 14], що дещо ускладнює систему визначення. Наприклад, у роботі [14] як робочий електрод використовували графітовий електрод з адсорбованим на нього медіатором ферроценом, а в роботі [8] медіатором слугувала аміносаліцилова кислота.

В іншій роботі [15] автори інформують про створення біосенсора для визначення лактози на основі мікробіологічних клітин *Kluyveromyces marxianus*, які містили фермент β -галактозидазу, та клітини *Glucobacter oxydans* з ферментом ГОД. Ці клітини були іммобілізовані з желатином на поверхні електродів за допомогою глутарового альдегіду. Перевага такого клітинного біосенсора полягала в тому, що клітини *Glucobacter oxydans* були здатні окиснювати обидва аномери глюкози, що давало змогу обходитись без ферменту мутаротази. Крім того, авторами було відзначено, що додавання DEAE-декстрану та інозиту до біоселективної мембрани біосенсорів підвищувало стабільність біосенсорів у 16 разів порівняно зі стабільністю біосенсорів без стабілізаторів.

У роботі [5] є повідомлення про створення амперометричного мультибіосенсора для визначення декількох сахаридів (лактози, мальтози, сахарози та глюкози). Авторами було показано також, що активність ферменту β -галактозидази в желатиновій мембрані більша, ніж в альбуміновій. Є також інформація [16] про розроблення біосенсора на основі ІСПТ для визначення лактози, до складу якого входила термофільна глюкочіназа та β -галактозидаза. Ферменти не втрачали активності при температурі +50 °С. Авторами статті [7] було розроблено амперометричний мультибіосенсор для визначення глюкози, галактози та лактози і здійснено його



успішну апробацію на практиці для визначення цих сахаридів у молоці.

Отже, на сьогодні більшість розроблених біосенсорів для визначення лактози є амперометричними [3–15]. Однак порівняно з кондуктометричними біосенсорами вони мають низку недоліків. Передусім це вимірювання з використанням високого потенціалу, що призводить до фарадеївських процесів на електродах та похибок через присутність у розчинах інших електроокиснювальних компонентів, таких, наприклад, як аскорбінова кислота. По-друге — необхідність у технологічно складному та дорогому електроді порівняння. До того ж, вартість амперометричних біосенсорів, як правило, є вищою порівняно з кондуктометричними.

Загалом, порівняно з іншими електрохімічними біосенсорами кондуктометричні методи аналізу є достатньо простими, зручними, точними і дозволяють вирішити низку важливих науково-дослідних та виробничих завдань [17–19]. Тому метою цієї роботи було розроблення кондуктометричного ферментного біосенсора для визначення лактози та вивчення його робочих характеристик.

Матеріали і методи

У дослідженнях використовували препарати ліофілізованих ферментів: глюкозооксидазу (ГОД) з *Penicillium vitale* (ЕС 1.1.3.4.) з активністю 130 од. акт./мг фірми «Діагностикум» (Львів, Україна); мутаротазу (ЕС 5.1.3.3.) з активністю 100 од. акт./мг фірми Biozyme Laboratories Ltd (Англія), β-галактозидазу (ЕС 3.2.1.23.) з активністю 149 од. акт./мг з *E.coli* фірми Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Німеччина). Бичачий сироватковий альбумін (БСА) (фракція V) та 50%-й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) було отримано від фірми Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Німеччина). Як субстрат застосовували лактозу та глюкозу, як буферний розчин — калійфосфатний розчин ($\text{K}_2\text{HPO}_4\text{--NaOH}$) фірми Merck (Німеччина). Інші неорганічні сполуки, що використовували в роботі, були вітчизняного виробництва та мали ступінь чистоти «х. ч.» та «ч. д. а.».

У роботі було застосовано кондуктометричні перетворювачі, виготовлені в Інституті фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова (Київ). Вони складаються з двох ідентичних пар золотих гребінчастих електродів, виготовлених вакуумним напиленням золота на основу із ситалу розміром 5×40 мм (рис. 1). Чутлива поверхня кожної

електродної пари становила приблизно 1,0×1,5 мм. Відстань між пальцями гребінок та ширина самих пальців гребінок — 20 мкм.



Рис. 1. Зовнішній вигляд кондуктометричних планарних гребінчастих перетворювачів

Виготовлення біоселективних мембран

Для виготовлення біоматриць за основу було взято метод іммобілізації ферментів за допомогою глутарового альдегіду [20]. Створюючи сенсори для визначення лактози, готували розчин зі вмістом 6% β-галактозидази, 8% мутаротазу, 6% ГОД, 20% гліцеролу у 20 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,4. Розчин для референтної мембрани робили таким же чином, але замість наважки ферментів брали 20% БСА. Обидві мембрани мали однаковий вміст білка. Перед нанесенням ці розчини змішували з 1%-м водним розчином ГА у співвідношенні 1:1. Після нанесення мембран на поверхню електродів сенсори висушували протягом 1 год на повітрі при кімнатній температурі. Перед початком роботи біосенсор відмивали від надлишку ГА буферним розчином, в якому й проводили подальші дослідження.

Експериментальна установка

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 містяться в комірці з досліджуваним розчином. Отриманий на електродах сенсора сигнал знімається з опор навантаження $R_n = 1$ кОм та надходить через диференційний підсилювач Unipan-233-6 (Польща) на селективний нановольтметр Unipan-233 (Польща). Після вольтметра цей сигнал подається на реєструвальний пристрій. У ході експериментів вимірювали залежність амплітуди вихідного сигналу від концентрації субстрату в розчині.

Методика вимірювання

Вимірювання проводили у калійфосфатному буферному розчині різної молярності за різних значень рН при кімнатній темпе-

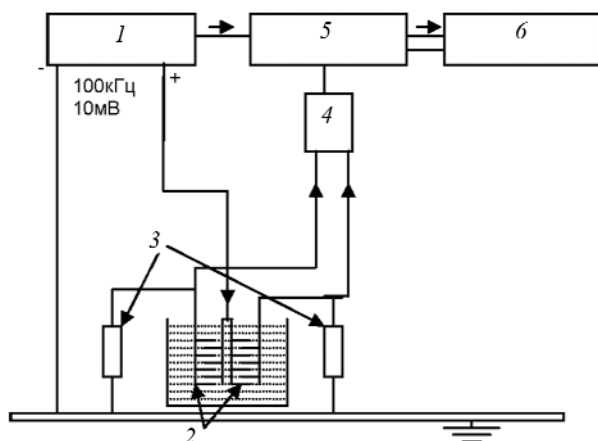


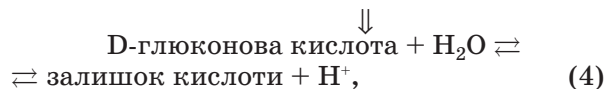
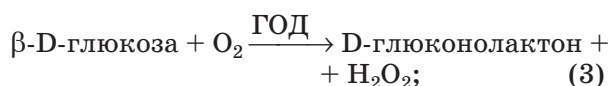
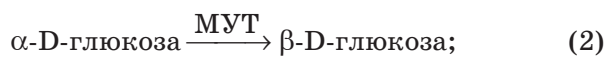
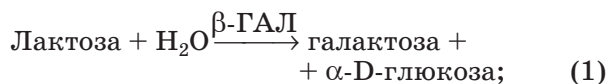
Рис. 2. Схема експериментальної установки для кондуктометричних вимірювань:

1 — генератор; 2 — електроди; 3 — опори навантаження; 4 — диференційний підсилювач; 5 — фазочутливий нановольтметр; 6 — реєструвальний пристрій

ратурі у відкритій комірці з інтенсивним перемішуванням. Спочатку сенсор розміщували у комірці для вимірювання об'ємом 2 мл, заповненій фосфатним буферним розчином. Для одержання 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. 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 із двох пар електродів з активною та неактивною мембраною, розташованих на одному перетворювачі.

Результати та обговорення

В основі роботи кондуктометричної біосенсорної системи для визначення лактози лежить каскад ферментативних реакцій:



де β -ГАЛ — β -галактозидаза, МУТ — мутаротаза, ГОД — глюкозооксидаза.

β -Галактозидаза, мутаротаза та глюкозооксидаза поетапно розщеплюють лактозу до пероксиду водню та D-глюконолактону. Глюконолактон, у 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 [16]. На рис. 3 наведено типові відгуки кондуктометричного біосенсора на додавання у комірку лактози та глюкози.

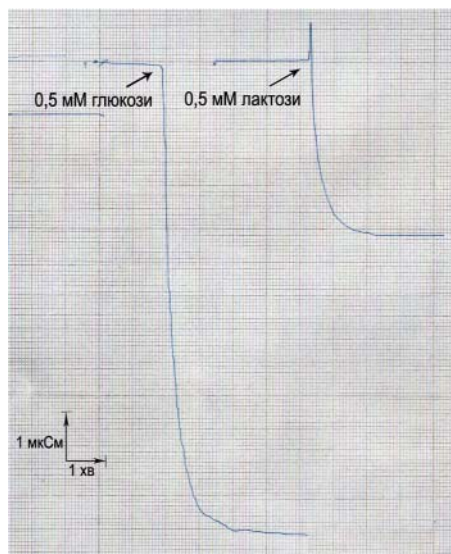


Рис. 3. Відгуки кондуктометричного біосенсора на додавання у комірку 0,5 мМ лактози та 0,5 мМ глюкози. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0.

На рис. 4 подано графіки залежності зміни провідності від концентрації глюкози (1) та лактози (2) лактозного біосенсора. Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5. З рисунка видно, що лінійний діапазон роботи біосенсора — до 0,75 мМ для глюкози й до 1,25 мМ для лактози. Мінімальна концентрація, яку можна було визначати біосенсором, становила 0,01 мМ для глюкози та лактози.

Оскільки лактозний сенсор дає відгук і на глюкозу, і на лактозу, для визначення саме лактози необхідною є наявність також глюкозного сенсора. У зв'язку із цим вимірювання лактози в зразках слід проводити у два етапи. Спочатку визначаємо концентрацію глюкози в зразку глюкозним сенсором, а потім — сумарну концентрацію лактози і глюкози у досліджуваному розчині за допомогою лактозного сенсора. Різниця цих двох концентрацій відповідає концентрації лактози в розчині. У перспективі в разі

використання перетворювача з трьома парами кондуктометричних електродів матиме можливість вимірювати ці величини одночасно.

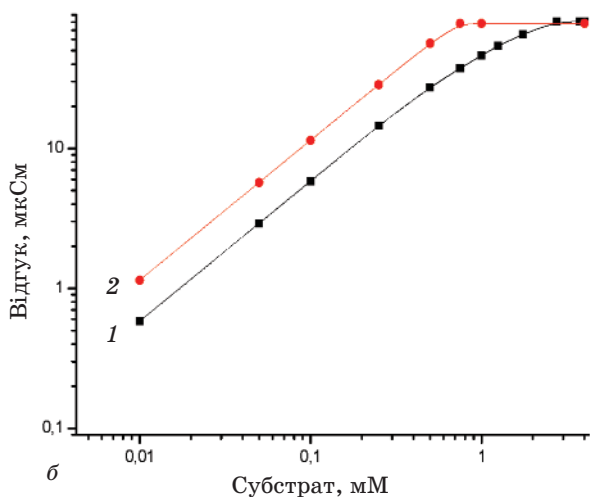
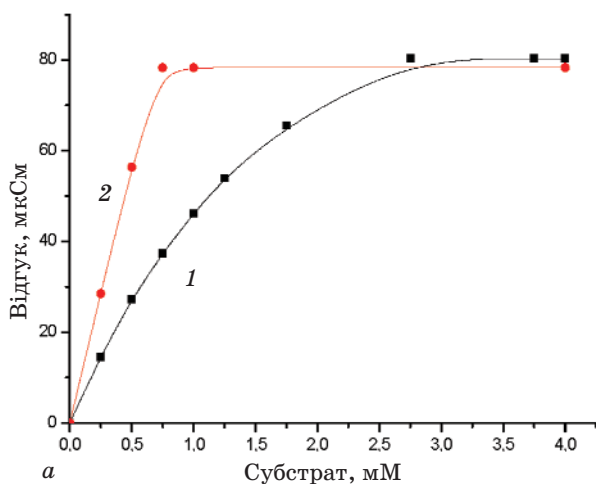


Рис. 4. Графіки залежності зміни провідності від концентрації лактози (1) та глюкози (2) лактозного біосенсора в лінійній (а) та логарифмічній шкалі (б).
Вимірювання проводили у 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5

В основі кондуктометричного методу, як відомо, лежить вимірювання зміни провідності аналізованого розчину. Ця зміна провідності може залежати як від самої ферментативної реакції, так і від характеристик розчину, в якому ця реакція відбувається. Тому передусім було досліджено вплив параметрів розчину (іонна сила, буферна ємність, рН) на величину відгуку нашого сенсора.

На рис. 5 показано залежність величин відгуків біосенсора від концентрації лактози у буферних розчинах різної концентрації. З рисунка випливає, що зі зміною концентрації буферного розчину змінюють-

ся величини відгуків біосенсора та лінійний діапазон визначення. У випадку роботи біосенсора в 20 та 30 мМ фосфатному буферному розчині чутливість біосенсора щодо лактози значно падала та лінійний діапазон визначення лактози зменшувався.

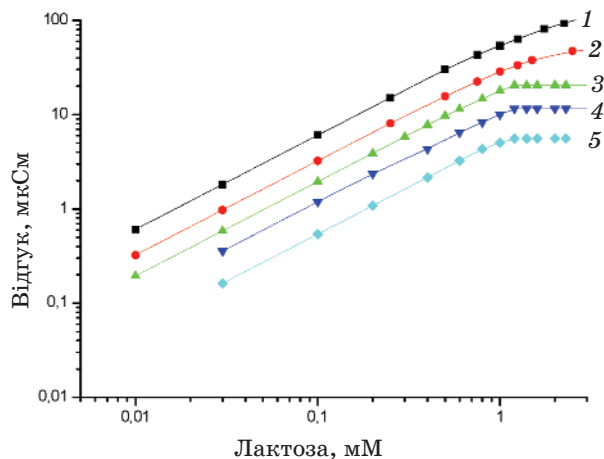


Рис. 5. Залежність величин відгуків біосенсора від концентрації лактози у фосфатному буферному розчині (рН 6,5) різної концентрації: 5 мМ (1), 10 мМ (2), 15 мМ (3), 20 мМ (4), 30 мМ (5)

На рис. 6 наведено залежність величин відгуків біосенсора на внесення 0,1 мМ глюкози та 0,1 мМ лактози від різних концентрацій буферного розчину. Також подано залежність співвідношень відгуків на 0,1 мМ глюкози та 0,1 мМ лактози від різних концентрацій буферного розчину. З графіка видно, що зі збільшенням буферної ємності співвідношення відгуків на 0,1 мМ глюкози та 0,1 мМ лактози наближується до одиниці, але водночас величина відгуків на глюкозу та лактозу зменшується. Зниження відгуків на субстрат у разі збільшення концентрації буферного розчину пов'язано зі зростанням фонові провідності та буферної ємності розчину, що слід врахувати під час проведення аналізів.

Однією з важливих характеристик буферного розчину, що може негативно впливати на вимірювання кондуктометричного біосенсора, є іонна сила. Щоб дослідити цей вплив, було проведено вимірювання величини сигналу на одну концентрацію субстрату (0,8 мМ лактози) із додаванням у розчин різних концентрацій КСl (до 50 мМ) (рис. 7). З отриманого графіка видно, що зі збільшенням іонної сили відгук на концентрацію субстрату зменшується за експонентою: спочатку спостерігається значне зменшення величини відгуків біосенсора, а при концентрації 20–50 мМ КСl величина сигналу становить менше 1% від початкового відгу-

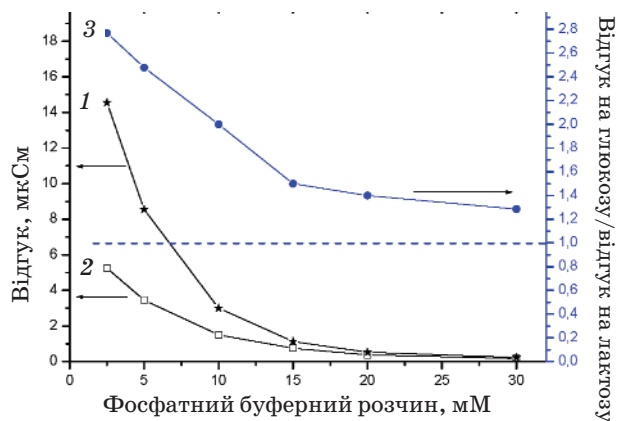


Рис. 6. Залежність величин відгуків біосенсора на 0,1 мМ глюкози (1) і 0,1 мМ лактози (2) та співвідношення відгуків на 0,1 мМ глюкози та 0,1 мМ лактози (3) від буферних розчинів різної концентрації

ку на лактозу без додавання KCl у комірку. Одна з головних причин такої залежності пов'язана зі зростанням фонові провідності розчину. Тому в разі проведення вимірювань за допомогою кондуктометричного біосенсора вкрай важливим є контроль іонної сили аналізованих зразків.

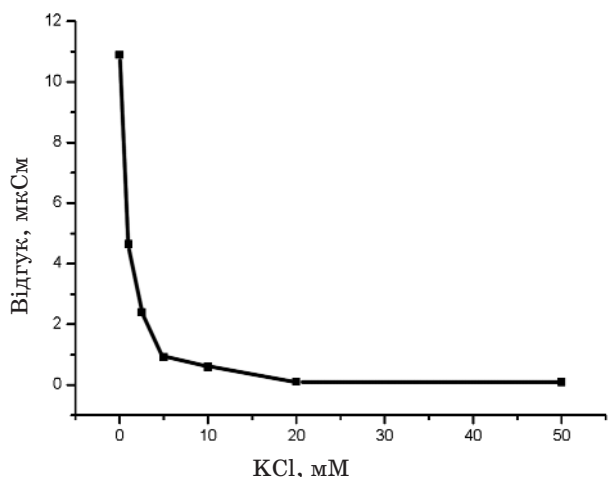


Рис. 7. Залежність величини відгуку кондуктометричного біосенсора для визначення лактози на внесення 0,8 мМ лактози у розчин від концентрації KCl у 10 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5

Як відомо, кожен фермент має рН-оптимум своєї роботи. Деякі ферменти після їх іммобілізації можуть змінювати свій рН-оптимум, зсуваючи його або в лужну, або в кислу ділянки. У нашому випадку маємо суміш трьох іммобілізованих на поверхню сенсора ферментів з різними рН-оптимумами. Тому наступним завданням було знайти оптимальний рН буферного розчину для роботи всіх ферментів, а відповідно й кондук-

тометричного біосенсора для визначення лактози. У даному експерименті ми не використовували універсальний буферний розчин, до складу якого входить боратний буферний розчин, тому що в присутності солей борату лактоза ізомеризується в лактулозу, а це, у свою чергу, призводить до зниження сигналу на лактозу приблизно вдвічі [14]. Оскільки активність роботи лактозного біосенсора у фосфатному буферному розчині є вищою, ніж в ацетатному [5], виміри проводили у фосфатному буферному розчині з різним рН (від 5,0 до 8,0). Графіки залежності величин сигналів на внесення 0,5 мМ лактози та 0,5 мМ глюкози від рН мали дзвоникоподібну форму з максимумом при рН 6,5 та рН 5,5 відповідно (рис. 8).

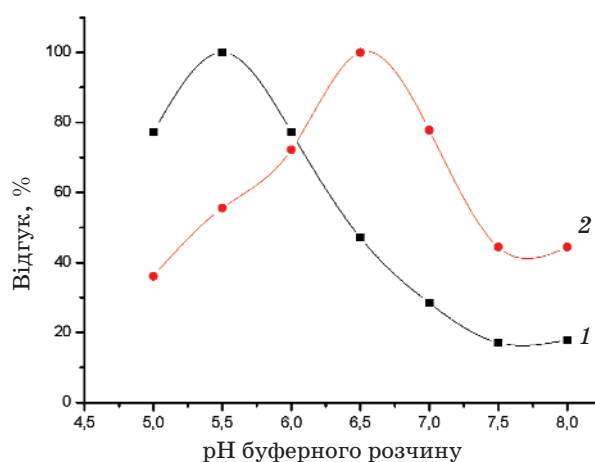


Рис. 8. Графік залежності відгуків лактозного біосенсора від рН розчину в разі додавання 0,5 мМ глюкози (1) та 0,5 мМ лактози (2). Вимірювання проводили в 10 мМ фосфатному буферному розчині. За 100% взято максимальну величину відгуків відповідного субстрату

Одержані нами результати узгоджуються з даними інших дослідників. Наприклад, у статті [8] було показано, що найвищі відгуки лактозного біосенсора отримано в діапазоні рН 6,0–6,2 фосфатного буферного розчину. Автори роботи [5] повідомляють про те, що рН-оптимум роботи їхнього лактозного сенсора у фосфатному буферному розчині дорівнював 6,5. Активність біосенсора та його рН-оптимум можуть змінюватися залежно від умов іммобілізації та типу буферного розчину. В нашому випадку оптимальним для роботи біосенсора є значення рН фосфатного буферного розчину 6,5. Це пов'язано з тим, що β-ГАЛ та МУТ мають оптимум роботи при рН 7,5, а ГОД — при рН 5,5, тому оптимальне значення рН для

функціонування цих трьох ферментів дорівнює середньому значенню рН-оптимумів усіх трьох ферментів.

Одними з найважливіших характеристик біосенсорів є операційна стабільність та відтворюваність сигналу. Протягом кожного з чотирьох робочих днів з інтервалом 30 хв отримували відгук біосенсора на одну концентрацію лактози (0,15 мМ), при цьому сенсор весь час між вимірюваннями залишався у буферному розчині з постійним перемішуванням. Вибрана для досліджень концентрація лактози знаходилася на лінійному відрізку калібрувальної кривої біосенсора. З рис. 9 видно, що сенсор характеризувався високою відтворюваністю сигналу.

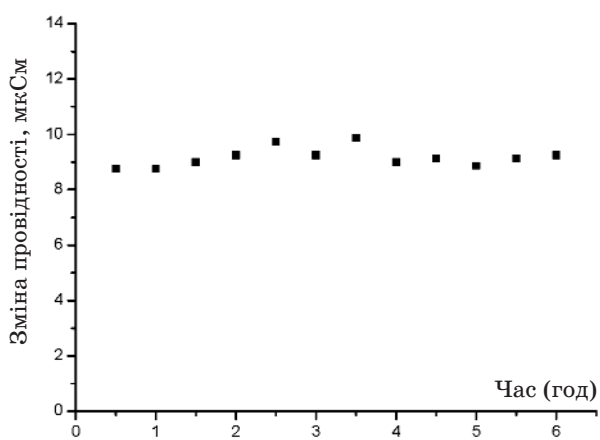


Рис. 9. Операційна стабільність сенсора для визначення лактози.

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5, у комірку вносили 0,15 мМ лактози

З метою можливої подальшої комерціалізації розробленого біосенсора було проведено низку дослідів з вивчення стабільності біосенсорів під час зберігання (рис. 10). Біосенсори зберігалися при температурі +4 °С в сухих умовах. На перший день після створення лактозних біосенсорів отримали відгук на внесення 0,15 мМ лактози, величину якого було прийнято за 100%. Подальші виміри проводили через певний проміжок часу (3–8 днів). Відгук біосенсора знизився на 22% упродовж трьох місяців, що є дуже високим показником стабільності.

Для проведення в подальшому робіт з реальними зразками слід було також здійснити перевірку селективності розробленого лактозного біосенсора, тому було проведено низку дослідів із вивчення впливу інтерферуючих компонентів на відгук лактозного біосенсора. Дослідження проводили в 10 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5, в експериментальну комірку вносили роз-

чин з 0,5 мМ можливої інтерферуючої речовини (таблиця). Відгук сенсора розраховували у процентах, причому за 100% було обра-но відгук сенсора на 0,5 мМ лактози.

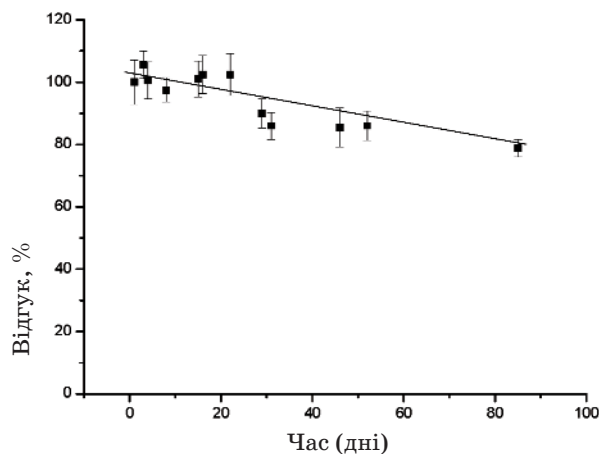


Рис. 10. Стабільність біосенсора для визначення лактози під час зберігання його в сухих умовах при температурі +4 °С.

Вимірювання проводили в 5 мМ фосфатному буферному розчині, рН 6,5; у комірку вносили 0,15 мМ лактози

Загалом, лактозний біосенсор виявився селективним стосовно низки інтерферуючих речовин, які можуть бути присутні у зразках, за винятком глюкози та мальтози. Відгук лактозного біосенсора на глюкозу є цілком очікуваним, оскільки до складу ферментної мембрани цього біосенсора входить глюкозооксидаза. Тому для визначення саме лактози у зразках, в яких може бути присутня глюкоза, необхідним є другий сенсор, чутливий тільки до глюкози.

Відгук кондуктометричного лактозного біосенсора на 0,5 мМ мальтози становить 8% від величини відгуку на таку саму концентрацію лактози. Оскільки в подальшому передбачається використовувати лактозний сенсор в основному для визначення лактози в молочних продуктах, де, як правило, мальтоза відсутня, то ця чутливість сенсора стосовно мальтози не буде впливати на точність аналізу.

Селективність біосенсора для визначення лактози

1мМ субстанції	Відносний відгук біосенсора, %
Лактоза	100,0
Глюкоза	172,5
Мальтоза	8,0
Сахароза	0
Фруктоза	0
Арабіноза	0
Маноза	0

Отже, створено кондуктометричний біосенсор для визначення лактози, в якому триферментна мембрана відіграє роль чутливого елемента, та досліджено його аналітичні характеристики у процесі роботи з модельними зразками (залежність відгуку від рН, іонної сили та буферної ємності робочого розчину). Розроблений кондуктометричний біосенсор характеризується високою операційною стабільністю та відтворюваністю сигналу.

Надалі передбачається відпрацювання методики визначення лактози в реальних зразках (зокрема, в кисломолочних продуктах).

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

ЛІТЕРАТУРА

1. Fox A., Thomson M. Adverse reactions to cows' // Milk Symposium: Metabolic Medicine. — 2007. — V. 17, N7. — P. 288–294.
2. Jager A., Bilitewski U. Screen-printed Enzyme Electrode for the Determination of Lactose // Analyst. — 1994. — V. 119, N6. — P. 1251–1255.
3. Sharma S. K., Singhal R., Malhotra B. D., Sehgal N. Lactose biosensor based on Langmuir-Blodgett films of poly(3-hexyl thiophene) // Biosensors and Bioelectronics. — 2004. — V. 20, N3. — P. 651–657.
4. Svorec J., Miertus S., Barlikova A. Hybrid biosensor for the determination of lactose // Anal. Chem. — 1990. — V. 62, N15. — P. 1628–1631.
5. Filipiak M., Fludra K., Gosciminska E. Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of oxygen electrode // Biosensors and Bioelectronics. — 1996. — V. 11, N4. — P. 355–364.
6. Mori T., Motonaga T., Okahata Y. Cast films of lipid-coated enzymes as selective sensors for disaccharides // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. — 1999. — V. 146, N1–3. — P. 387–395.
7. Rajendran V., Irudayaraj J. Detection of glucose, galactose, and lactose in milk with a microdialysis-coupled flow injection amperometric sensor // J. of Dairy Sci. — 2002. — V. 85, N6. — P. 1357–1361.
8. Eshkenazi E., Maltz B., Zion J., Rishpon. A three-cascaded-enzymes biosensor to determine lactose concentration in raw milk // Ibid. — 2000. — V. 83, N9. — P. 1939–1945.
9. Maestre E., Katakis I., Narvaez A., Dominguez E. A multianalyte flow electrochemical cell: application to the simultaneous determination of carbohydrates based on bioelectrocatalytic detection // Biosensors and Bioelectronics. — 2005. — V. 21, N5. — P. 774–781.
10. Kullick T., Bock U., Schubert J. et al. Electroanalytical chemistry and sensor // Anal. Chim. Acta. — 1995. — V. 300, N1–3. — P. 25–31.
11. Kullick T., Beyer M., Henning J. et al. Application of enzyme field-effect transistor sensor arrays as detectors in a flow-injection system for simultaneous monitoring of medium components. Part I. Preparation and calibration // Ibid. — 1994. — V. 296, N3. — P. 263–269.
12. Kullick T., Bock U., Schubert J. et al. Application of enzyme-field effect transistor sensor arrays as detectors in a flow-injection analysis system for simultaneous monitoring of medium components. Part II. Monitoring of cultivation processes // Ibid. — 1995. — V. 300, N1–3. — P. 25–31.
13. Stoica L., Ludwig R., Haltrich D., Gorton L. Third-Generation Biosensor for Lactose Based on Newly Discovered Cellobiose Dehydrogenase // Anal. Chem. — 2006. — V. 78, N2. — P. 393–398.
14. Tkac J., Sturdik E., Gemeiner P. Novel glucose non-interference biosensor for lactose detection based on galactose oxidase-peroxidase with and without co-immobilised β -galactosidase // Analyst. — 2000. — V. 125, N7. — P. 1285–1289.
15. Svitel J., Curilla O., Tkac J. Microbial cell-based biosensor for sensing glucose, sucrose or lactose // Biotechnol. Appl. Biochem. — 1998. — V. 27, N2. — P. 153–158.
16. Aoki K., Suzuki H., Ishimaru Y. et al. Thermophilic glucokinase-based sensors for the determination of various saccharides and glycosides // Sensors and Actuators B. — 2005. — V. 108, N1–2. — P. 727–732.
17. Дзядевич С. В., Солдаткін О. П. Кондуктометричний метод вимірювань в ферментному аналізі // Укр. біохім. журн. — 1994. — Т. 66, №4. — С. 30–42.
18. Дзядевич С. В. Кондуктометричні ферментні біосенсори: теорія, технологія, застосування // Біополімери і клітина. — 2005. — Т. 21, №2. — С. 91–106.
19. Дзядевич С. В., Шульга А. А., Пацковський С. В. і др. Тонкопленочний кондуктометричний датчик для ферментних біосенсорів // Електрохімія. — 1994. — Т. 30, №8. — С. 982–987.
20. Пешкова В. М., Солдаткін О. О., Дзядевич С. В. Оптимізація методики визначення сахарози в соках та солодких напоях кондуктометричним ферментним біосенсором // Біополімери і клітина. — 2007. — Т. 23, №6. — С. 501–510.

**ФЕРМЕНТНЫЙ
КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛАКТОЗЫ**

*В. Н. Пешкова^{1,2}
О. Я. Саяпина^{1,3}
А. А. Солдаткин¹
О. Л. Кукла⁴
С. В. Дзядевич¹*

¹Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко

³Национальный университет
пищевых технологий, Киев

⁴Институт физики полупроводников
им. В. Е. Лашкарева НАН Украины, Киев

E-mail: victoir@ukr.net

Разработан ферментный кондуктометрический биосенсор для определения лактозы. Биоселективным элементом является триферментная мембрана (глюкозооксидаза, мутаротаза, β -галактозидаза), иммобилизованная на поверхность кондуктометрического преобразователя. Исследованы рабочие характеристики полученного биосенсора. Время определения концентрации лактозы в растворе составляло 1–2 мин, линейный диапазон работы биосенсора — от 0,01 мМ до 0,75 мМ для глюкозы и от 0,01 мМ до 1,25 мМ для лактозы. Изучена зависимость величины отклика биосенсора на внесение субстрата от рН, ионной силы и буферной емкости рабочего раствора и представлены данные по селективности биосенсора и стабильности его при хранении. Созданный кондуктометрический биосенсор характеризуется высокой операционной стабильностью и воспроизводимостью сигнала.

Ключевые слова: кондуктометрический ферментный биосенсор, лактоза, глюкоза, глюкозооксидаза, мутаротаза, β -галактозидаза.

**ENZYME CONDUCTOMETRIC
BIOSENSOR FOR LACTOSE CONTENT
DETERMINATION**

*V. M. Pyeshkova^{1,2}
O. Y. Saiapina^{1,3}
O. O. Soldatkin¹
O. L. Kukla⁴
S. V. Dzyadevych¹*

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

²National Taras Shevchenko
University of Kyiv

³National Food Industry University, Kyiv

⁴Institute of Semiconductor Physics
of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: victoir@ukr.net

Enzyme conductometric biosensor for lactose determination has been developed. Three-enzyme membrane (glucose oxidase, mutarotase, β -galactosidase) immobilized on the surface of conductometric transducer was used as biosensitive element. The analytical characteristic of the biosensor obtained were investigated. The time of lactose analysis in solution was 1–2 minutes, linear range was from 0,01 mM to 0,75 mM for glucose determination and from 0,01 mM to 1,25 mM for lactose determination. Dependence of responses of biosensor to substrate on pH, ionic strength, buffer capacity of work solution were studied, and the data of selectivity and storage stability were presented. The developed conductometric biosensor is featured in high operational stability and signal reproducibility.

Key words: conductometric enzyme biosensor, lactose, glucose, glucose oxidase, mutarotase, β -galactosidase.