

МЕТОДИ

УДК 577.15:573.6

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГЛЮКОЗИ У ВИНОМАТЕРІАЛІ ЕНЗИМНИМ АМПЕРОМЕТРИЧНИМ БІОСЕНСОРОМ

Т. Б. Горюшкіна^{1, 2}

О. В. Остроухова³

О. П. Солдаткін¹

С. В. Дзядевич¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ

³Національний інститут винограду та вина «Магарач», Ялта

E-mail: tatiana_goryushkina@yahoo.com

Відпрацьовано методику визначення вмісту глюкози у вині за допомогою амперометричного біосенсора на основі платинового друкованого електрода SensLab та глюкозооксидази (ГОД). Досліджено селективність біосенсорів, розроблених із застосуванням двох різних методів іммобілізації ГОД. Показано, що датчик на основі ГОД, іммобілізованої у парах глутарового альдегіду (ГА), не дає відгуку на основні інтерферуючі речовини вина, на відміну від біосенсора з ГОД, іммобілізованою у полімері полі-(3,4-етилендіокситіофен) (ПЕДТ). Вивчено операційну стабільність створеного датчика на основі іммобілізованої у парах ГА ГОД та його стабільність під час зберігання. За допомогою розробленого біосенсора проведено аналіз концентрації глюкози у винах різного типу та в суслі. Показано високу кореляцію отриманих результатів із даними високоефективної рідинної хроматографії. Встановлено, що біосенсор з іммобілізованою у полімері ПЕДТ ГОД має надзвичайно широкий динамічний діапазон роботи і може бути успішно застосований для аналізу глюкози в середовищах, які не містять етанолу та гліцеролу, наприклад у крові.

Ключові слова: амперометричний біосенсор, глюкоза, вино, сусло.

Глюкоза — один із головних тваринних і рослинних вуглеводів. Її кількісне визначення є необхідним у біохімії, клінічній хімії та харчовій промисловості [1].

Особливе практичне значення має аналіз глюкози у виноробстві, адже глюкоза є джерелом вуглецю для дріжджів, які здійснюють ферментацію виноматеріалу, та субстратом, що лімітує їх ріст [2, 3]. До того ж моніторинг вмісту глюкози у суслі (бажано разом з іншими ключовими компонентами) дозволяє контролювати процес бродіння та, в разі потреби, оперативно регулювати його, запобігаючи тим самим значним економічним витратам [4]. Моносахариди також відіграють важливу роль у формуванні органолептичних якостей вина, пом'якшують і збагачують його смак, а вступаючи у реакції меланоїдоутворення, поліпшують аромат та колір вин типу мадери, портвейну, марсали. Окрім того, вуглеводи є джерелом утворення діоксиду вуглецю у процесі виробництва ігристих вин [5].

Існує низка традиційних методів кількісного аналізу глюкози у вині — газова та

високоефективна рідинна хроматографія, спектрофотометрія, рефрактометрія, ензиматичний аналіз, ЯМР- та мас-спектроскопія, капілярний електрофорез [3, 6]. Проте аналітична процедура із застосуванням більшої з перерахованих методів є довготривалою, трудомісткою, затратною і часто потребує значної кількості хімічних реактивів, деякі з яких є небезпечними для навколишнього середовища [3]. Окрім цього, застосування класичних методів для аналізу глюкози у вині інколи не забезпечує повної достовірності результатів [7].

Дедалі зростаюча потреба у кількісному визначенні глюкози зумовлює необхідність в більш швидкому, зручному та дешевому методі детекції такої сполуки, який можна було б упровадити безпосередньо у процес винного виробництва. Проведені останнім часом дослідження свідчать, що ефективним альтернативним методом аналізу глюкози у вині може стати застосування амперометричного біосенсора, який уможливує високу селективність і чутливість визначення та не потребує складного устаткування

і підготовки проби [8]. Окрім того, відгук амперометричних біосенсорів не залежить від буферної ємності та іонної сили розчину, в якому здійснюється вимірювання, а це, безперечно, є великою перевагою при проведенні аналізів реальних зразків [7].

Амперометричні біосенсори, призначені для аналізів глюкози, найчастіше розробляють на основі трьох ензимів — НАД⁺-залежної глюкозодегідрогенази (НАД⁺-ГД) [9], піролохінолін хінонзалежної глюкозодегідрогенази (ПХХ-ГД) [2, 10–12] або глюкозооксидази (ГОД) [1, 7, 13–20]. При цьому у біосенсорів з іммобілізованою НАД⁺-ГД є суттєвий недолік: вони потребують наявності екзогенного кофактора НАД⁺, а часто ще й медіатора, що ускладнює аналітичну процедуру, зменшує стабільність датчиків та підвищує витрати на їх використання [2]. На відміну від НАД⁺-ГД, ПХХ-ГД має у своєму складі кофактор піролохінолін хінон [2, 12], однак через його слабкий зв'язок з апоензимом біосенсори на основі цього ензиму також, як правило, не виявляють високої стабільності та придатні лише для одноразового використання [11, 12]. Застосування ГОД для розроблення глюкозного біосенсора видається більш перспективним, оскільки цей ензим має у своєму складі сильнозв'язаний природний кофактор (ФАД) та виявляє високу стабільність після іммобілізації у біоселективну мембрану [18, 19].

Створені із застосуванням НАД⁺- та ПХХ-залежних глюкозодегідрогеназ біосенсори здатні детектувати від 9–10 мкМ глюкози [2, 9, 12]. Межа визначення біосенсорів на основі ГОД є дещо вищою — 30–60 мкМ [7, 13, 14, 17, 19], і лише для описаного у роботі [15] датчика вона становила 4,4 мкМ. Верхня межа лінійного діапазону для біосенсорів з іммобілізованою ГД становить 0,8 мМ [2, 9], з ГОД — 1,5 [17], 3 [13], 8 [7] і навіть 25 мМ [16].

Датчики з іммобілізованою ГОД — високостабільні, вони виявляють 100% активності через місяць [13, 16] та до 95% через 8 місяців зберігання [19]. Стабільність біосенсорів, створених на основі дегідрогеназ, є значно нижчою — 80% від початкового сигналу через місяць зберігання для ПХХ-ГД [2] та 30% через 2 тижні для НАД⁺-ГД [9]. Операційна стабільність біосенсорів з іммобілізованою ГОД також є вищою — 100% активності через 120 год безперервної роботи [16], тимчасом як датчик з ПХХ-ГД після 20 год вимірювань зберігає 60% від початкового відгуку [2].

Наведені дані свідчать про перспективність розроблення глюкозного біосенсора саме на основі глюкозооксидази, однак його використання для контролю якості вина може супроводжуватися низкою складнощів під час проведення аналізу. Передусім це пов'язано з наявністю у вині цілого спектра різноманітних речовин, що можуть впливати на відгук біосенсора і спричинювати виникнення похибок, а іноді й унеможливити застосування біосенсорів у виноробстві. До таких інтерферуючих речовин належить, зокрема, аскорбінова кислота, яка міститься у вині та суслі у значній кількості й у процесі аналізу призводить до появи неспецифічного сигналу, ускладнюючи інтерпретацію результатів [7]. Електрохімічно активні фенольні компоненти, на які особливо багаті червоні вина, також можуть істотно впливати на роботу амперометричного біосенсора [18], особливо вони перешкоджають аналізу сухих вин з незначним вмістом глюкози — менше 1 г/л [20]. Наприклад, у роботі [7] повідомляється, що біосенсор на основі іммобілізованої у парах глутарового альдегіду (ГА) ГОД та вуглецевого електрода дає відгук близько 200 нА на внесення в електрохімічну комірку 0,25 мМ аскорбінової кислоти. Нанесення додаткової нафійонової мембрани дозволило знизити цей неспецифічний сигнал майже у 10 разів.

У ще одному дослідженні [1] встановлено, що біосенсор з іммобілізованою у парах ГА ГОД дає незначний відгук на етанол та лимонну кислоту. Проте істотний відгук спостерігався у цьому разі на внесення в електрохімічну комірку 10 мМ аскорбінової кислоти або 20 мМ фруктози — він був еквівалентним відгуку на 0,138 мМ глюкози. Іншою групою дослідників [19] встановлено, що іммобілізована у парах ГА ГОД не реагує на етанол та фруктозу, проте на внесення 10 мМ аскорбінової кислоти дає відгук, рівний відгуку на 0,36 мМ глюкози.

Дослідження селективності біосенсора на основі іммобілізованої ПХХ-ГД показало, що він не реагує на внесення в електрохімічну комірку етанолу та гліцеролу [2]. Аналіз впливу інших інтерферуючих речовин на роботу створеного глюкозного біосенсора не проводився.

Таким чином, залежність роботи глюкозних датчиків від інтерферуючих речовин ускладнює, а іноді й унеможливає визначення за їх допомогою вмісту глюкози у реальних зразках виноматеріалів. Тому в разі використання глюкозних біосенсорів для аналізу вина та виноматеріалів їхня селективність

має бути поліпшена, а неспецифічний відгук — мінімізований.

Метою даної роботи була оптимізація методики визначення глюкози амперометричним біосенсором на основі іммобілізованої глюкозооксидази та платинового друкованого електрода SensLab для проведення її аналізу у винах та виноматеріалах.

Матеріали і методи

У роботі використовували ензим глюкозооксидазу з *Penicillium vitale* виробництва фірми КНПО «Діагностикум» (Львів, Україна) з активністю 130 од. акт./мг.

Для електрохімічної полімеризації ензиму застосовували мономер 3,4-етилендіокситіофен (ЕДТ) виробництва фірми Baytron M (Німеччина) та полі(етиленгліколь) 1450 фірми Sigma (Швейцарія). Для іммобілізації ензиму використовували бичачий сироватковий альбумін (БСА) виробництва фірми Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l. (Франція) та глутаровий альдегід виробництва фірми Fluka (Швейцарія).

Також у роботі застосовували реагенти $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , глюкозу та L-аскорбінову кислоту виробництва фірми Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l. (Франція), пероксид водню виробництва фірми «Фаргомед» (Україна), лактат натрію виробництва фірми Sigma (США), етанол виробництва фірми Fluka (Німеччина) і гліцерол виробництва України. Усі реактиви, як вітчизняного, так й імпортного виробництва були кваліфікації «ос. ч.» і «х. ч.».

Вимірювання. Усі електрохімічні експерименти було виконано за допомогою традиційної триелектродної системи, в якій друкований електрод SensLab (SensLab GmbH, Leipzig, Німеччина) поєднав у собі всі три електроди: платиновий робочий, допоміжний та електрод порівняння [21].

Платинові друковані електроди SensLab досліджували на відтворюваність та працездатність у діапазоні потенціалу від 0 до +600 мВ (швидкість розгортання потенціалу 20 мВ/с). Циклічну вольтамперометрію було виконано на потенціостаті PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди). На рис. 1 наведено циклічну вольтамперограму, отриману на промисловому платиновому електроді SensLab у робочому буфері з додаванням 50 мкМ пероксиду водню.

Встановлено, що з додаванням у робочу комірку пероксиду водню спостерігається поява окиснювального струму та підвищення сигналу датчика. Як компроміс між чут-

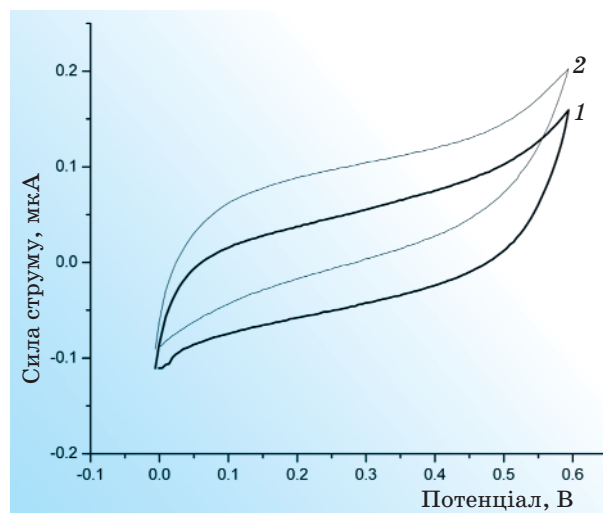


Рис. 1. Циклічна вольтамперограма, отримана на промислових платинових друкованих електродах SensLab у фосфатному буфері (1) та з додаванням 50 мкМ пероксиду водню (2)

ливістю біосенсора та зменшенням впливу на його відгук інтерферуючих частинок (які зазвичай окиснюються при більш високих потенціалах) потенціал +200 мВ було обрано нами як робочий.

Амперометричне вимірювання за постійного потенціалу проводили в електрохімічній комірці об'ємом 5 мл за допомогою потенціостата PalmSens.

Іммобілізація ГОД електрохімічною полімеризацією у полімері ЕДТ. Процес електрохімічної полімеризації становить особливий інтерес, тому що є технологічно зручним. Він дозволяє обирати й підтримувати розмір, форму і товщину матриці та забезпечує чіткий контроль за процесом осадження ензиму і носія [22, 23]. Окрім того, одержані із застосуванням цього методу напівпроникні полімерні плівки можуть виступати селективним бар'єром для електрохімічно активних інтерферуючих частинок, таких як аскорбінова кислота [16, 23].

Для електрохімічної полімеризації у роботі використовували суміш компонентів, приготованих у 20 мМ фосфатному буфері, рН 6,2, яка складалася з 10^{-2} М 3,4-етилендіокситіофену, 10^{-3} М поліетиленгліколю та 30 мг/мл розчину ГОД.

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

Іммобілізація ГОД у парах глутарового альдегіду. Для утворення біоселективних мембран готували суміш, що містила 30 мг/мл ГОД та 5 мг/мл БСА в 10 мМ фосфатному буфері, рН 7,2. У суміш додавали

гліцерол до кінцевої концентрації 10% для стабілізації іммобілізованого ензиму, а також для запобігання передчасному висиханню суміші, нанесеної на поверхню перетворювача. Для полімеризації мембран датчики вміщували в атмосферу насичених парів глутарового альдегіду на 10 хв, після чого підсушували на повітрі.

Визначення вмісту глюкози у модельних розчинах. Вимірювання проводили при кімнатній температурі у відкритому об'ємі за інтенсивного перемішування. Як робочий буфер використовували розчин 20 мМ KH_2PO_4 — Na_2HPO_4 , рН 7,2, оскільки, як було встановлено [8, 19], саме такий рН є оптимальним для функціонування іммобілізованої ГОД.

Концентрацію субстратів змінювали, додаючи певні аліквоти концентрованих розчинів. Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали робочим буферним розчином до стабілізації базового сигналу.

Визначення вмісту глюкози у вині та в суслі. Аналіз глюкози проводили у 12 зразках вин різного типу, а також у 2 зразках білих та червоних виноматеріалів, вироблених в умовах мікровиноробства в Інституті винограду та вина «Магарач».

Вимірювання вмісту глюкози у вині та в суслі за допомогою амперометричного біосенсора проводили у 20 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,2, при кімнатній температурі у відкритому об'ємі за інтенсивного перемішування. Визначення концентрації глюкози здійснювали за допомогою методу стандартних додавань. Для проведення аналізу пробу розводили у 250–1 000 разів. Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали буферним розчином до стабілізації базового сигналу.

Контрольне визначення глюкози у суслі та в готових винах проводили за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на хроматографі Agilent з використанням рефрактометричного детектора.

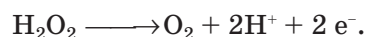
Результати та обговорення

Робота амперометричних біосенсорів на основі ГОД базується на такій ензиматичній реакції:



Процес ензиматичного перетворення глюкози супроводжується виділенням електрохімічно активної речовини — перок-

сиду водню, що окиснюється з утворенням електронів, які реєструються амперометричним перетворювачем:



На перших етапах роботи для іммобілізації ГОД застосовували метод електрохімічної полімеризації у полімері ПЕДТ, що довів свою ефективність під час розроблення амперометричного біосенсора для визначення лактату [24]. Калібрувальну криву амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої у ПЕДТ глюкозооксидази подано на рис. 2. Мінімальна концентрація глюкози, що визначається розробленим біосенсором, становить 0,04 мМ, діапазон визначення вмісту глюкози в межах 0,04 — 50 мМ.

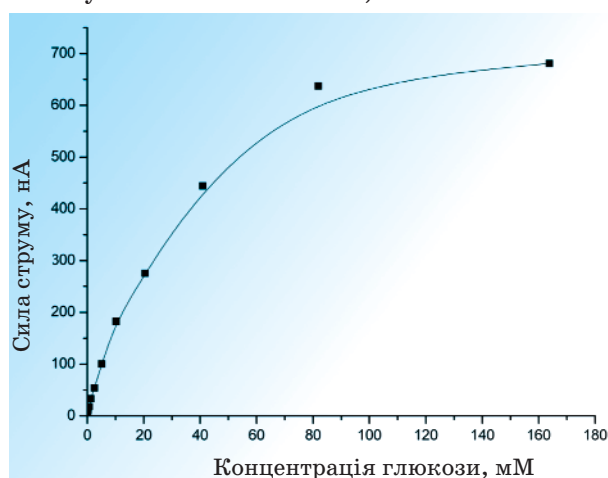


Рис. 2. Калібрувальна крива амперометричного біосенсора на основі платинового друкованого електрода SensLab та іммобілізованої у ПЕДТ глюкозооксидази.

Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

Такий діапазон роботи біосенсора виявився неочікуваним, оскільки він був значно ширшим за визначений для біосенсорів з іммобілізованою іншими методами ГОД, описаних у роботах [1, 7, 13, 14, 17]. Було зроблено припущення, що глюкоза може окиснюватись на електродах без використання ензиму. Для дослідження цього феномену на поверхню амперометричного перетворювача замість ГОД було іммобілізовано бичачий сироватковий альбумін у ПЕДТ і отримано відгуки на внесення в електрохімічну комірку глюкози та інших основних компонентів вина (рис. 3,а). Як видно з рисунка, полімерна мембрана з ПЕДТ без ензиму дає відгуки на етанол та гліцерол, проте практично не реагує на глюкозу у межах концентрацій, в яких реєструється

надзвичайно широкий динамічний діапазон роботи біосенсора з іммобілізованою ГОД. Окрім того, у роботі [24] було показано, що біосенсор на основі лактатоксидази, електрохімічно іммобілізованої на поверхню амперометричного електрода SensLab у ПЕДТ, також не давав сигналу на глюкозу. При цьому нами встановлено, що платиновий друкований електрод SensLab сам по собі, без будь-якої ензимної мембрани, практично не дає відгуку на основні інтерферуючі речовини вина (рис. 3, б). Усе це свідчить про те, що такий нетипово широкий динамічний діапазон створеного датчика не є результатом неспецифічного окиснення глюкози, а зумовлений конформаційними змінами глюкозооксидази під час електрохімічної іммобілізації в ПЕДТ. Варто також зазначити, що у роботі [16], в якій ГОД було іммобілізовано на поверхню платинового електрода також шляхом електрохімічної полімеризації у полімері полі-(*o*-фенілендіамін), верхня межа динамічного діапазону визначення біосенсора теж була досить високою — 25 мМ.

Після одержання таких перспективних результатів біосенсор з іммобілізованою в ПЕДТ ГОД досліджували на селективність. Було отримано калібрувальні криві розробленого датчика за етанолом (у межах концентрацій від 1 до 160 мМ), гліцеролом (0,05–51 мМ), лактатом (0,5–40 мМ) та аскорбіною кислотою (0,001–0,5 мМ). З рис. 4 можна зробити висновок, що іммобілізована у ПЕДТ ГОД майже не реагує на лактат та аскорбінову кислоту, проте дає істотні відгуки на внесення в електрохімічну комірку гліцеролу та етанолу, причому величина сигналу біосенсора на етанол становить близько 50% від величини відгуку на еквівалентну концентрацію глюкози. Оскільки вміст етанолу у винах є великим (до 20% за об'ємом [3]), очевидно, що аналіз вина за допомогою такого біосенсора супроводжуватиметься значною похибкою. Платиновий друкований електрод SensLab без ензимної мембрани, як видно з рис. 3, б, дає дуже малі неспецифічні відгуки на етанол та гліцерол (15 нА та 12 нА на додавання 100 мМ етанолу і гліцеролу відповідно). Тобто поява неспецифічного сигналу глюкозного біосенсора на етанол та гліцерол зумовлена реакцією останніх не з поверхнею голого електрода, а з електродом, модифікованим ПЕДТ (рис. 3, а), і цей метод іммобілізації ГОД є непридатним у разі створення біосенсора для аналізу глюкози у вині. Тому з метою зниження неспецифічного сигналу

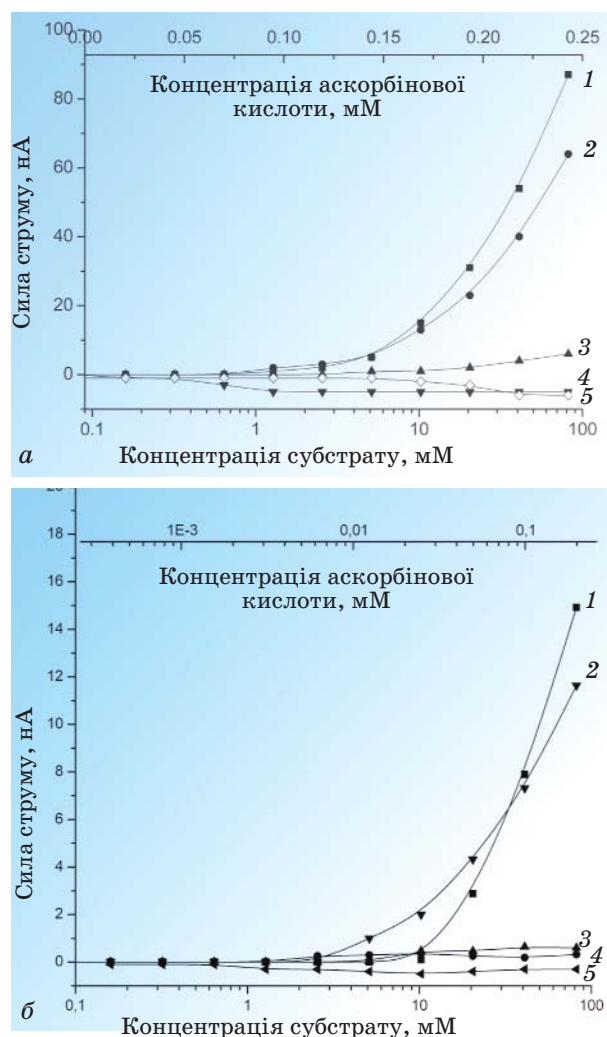


Рис. 3. Відгуки платинового друкованого електрода SensLab з іммобілізованим у ПЕДТ бічачим сироватковим альбуміном (а) та без ензимної мембрани (б) на внесення в електрохімічну комірку різних концентрацій: етанолу (1); гліцеролу (2); глюкози (3); лактату (4); аскорбінової кислоти (5).

Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

глюкозного біосенсора нами було використано інший метод іммобілізації ГОД на поверхню платинового друкованого електрода SensLab, а саме — іммобілізацію в парах глутарового альдегіду в БСА мембрані.

На рис. 5 наведено калібрувальну криву амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої у парах ГА глюкозооксидази. Мінімальна концентрація глюкози, що визначається, становить 0,04 мМ, як і у випадку електрохімічної полімеризації у ПЕДТ. Лінійний діапазон цього біосенсора є значно вужчим 0,04–2,5 мМ, що повністю узгоджується з попередніми роботами [1, 17],

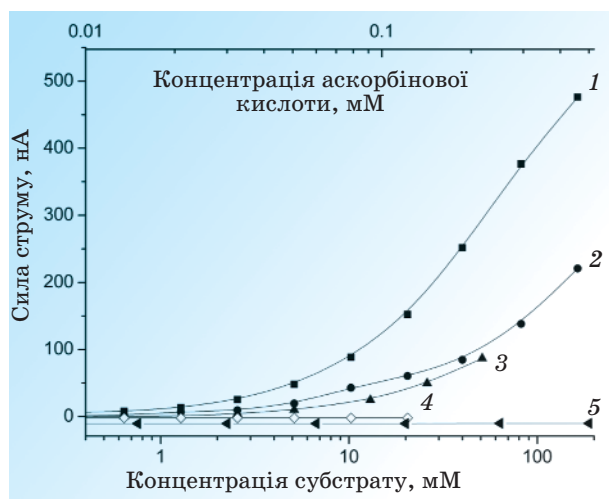


Рис. 4. Відгуки амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої в ПЕДТ глюкозооксидази на внесення в електрохімічну комірку різних концентрацій: глюкози (1); етанолу (2); гліцеролу (3); лактату (4); аскорбінової кислоти (5). Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

в яких показано, що обмеження за верхньою межею визначення глюкози (близько 2 мМ) пов'язано саме з браком у розчині кисню — ко-субстрату ензиматичної реакції.

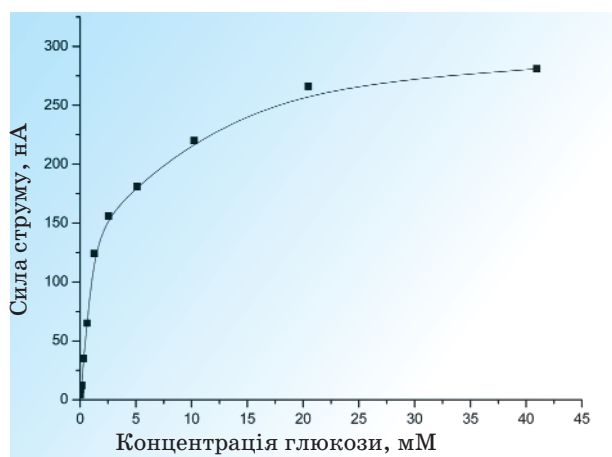


Рис. 5. Калібрувальна крива амперометричного біосенсора на основі платинового друкованого електрода SensLab та іммобілізованої у ГА глюкозооксидази.

Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

Аналіз селективності розробленого біосенсора показав, що іммобілізована у парах ГА ГОД зовсім не реагує на лактат та гліцерол, дає мінімальний негативний сигнал на аскорбінову кислоту та незначний відгук на

етанол у концентраціях понад 10 мМ (рис. 6). Таким чином, створений на основі ГОД, іммобілізованої у парах ГА, амперометричний біосенсор демонструє кращу, порівняно з біосенсором на основі ГОД у ПЕДТ, селективність, і його відгук на глюкозу значно перевищує величину неспецифічних сигналів на основні компоненти вина.

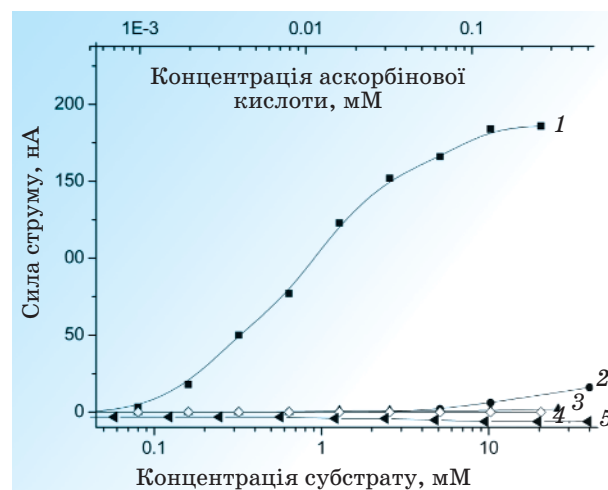


Рис. 6. Відгуки амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої в ГА глюкозооксидази на внесення в електрохімічну комірку різних концентрацій: глюкози (1); етанолу (2); гліцеролу (3); лактату (4); аскорбінової кислоти (5). Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

З метою встановлення впливу на роботу створеного датчика інших компонентів вина (наприклад, фенольних сполук), нами було проведено такий дослід. До проби вина Кара-Даг було додано препарат ГОД у кількості 1 мг і проведено інкубацію з ензимом для розщеплення глюкози (згідно з даними ВЕРХ, концентрація глюкози у цьому вині становить 83 г/л). Потім було отримано відгуки біосенсора на внесення 10 мкл цієї суміші, відібраної через певні проміжки часу після змішування проби та ензиму. Показано, що вже через годину інкубації суміші величина відгуку біосенсора зменшилась у 2 рази, а через 24 год інкубації, коли глюкозу було повністю розщеплено ензимом, біосенсор не реагує на внесення проби вина в електрохімічну комірку. Цей експеримент свідчить, що нами було розроблено дійсно високоспецифічний та селективний біосенсор для аналізу глюкози у вині.

Дослідження чутливості та селективності глюкозного амперометричного біосенсора

на основі іммобілізованої у парах ГА ГОД уможливило проведення за його допомогою аналізу глюкози у реальних зразках.

На першому етапі роботи з виноматеріалами визначали оптимальне розведення проб вина для аналізу їх за допомогою розробленого амперометричного біосенсора. На рис. 7 зображено відгуки біосенсора на основі іммобілізованої ГОД на внесення в електрохімічну комірку різних аліквот сусла та трьох типів вин з різним вмістом глюкози, що відповідало розведенню у 5 000, 1 000, 500, 250, 100 та 50 разів. Для дослідження було використано проби вина аліготе (вміст глюкози, згідно з методом ВЕРХ 0,12 г/л, що становить 0,67 мМ), мадера (7 г/л, або 39 мМ глюкози), портвейн білий (33 г/л, або 183 мМ глюкози), а також сусло біле (125 г/л або 694,4 мМ глюкози). З рисунка видно, що для сухого вина аліготе розведення більш ніж у 500 разів є непридатним через дуже низький вміст глюкози у пробі. Сусло, навпаки, не має сенсу розводити менше, ніж у 250 разів, оскільки у діапазоні розведень 50–250 відгук біосенсора на пробу майже не змінюється через насичення ензиму субстратом. Для двох інших проб вина чітка прямолінійна залежність між об'ємом внесеної пробі та відгуком біосенсора спостерігається при розведенні у 100–500 разів.

Враховуючи одержані результати, для подальшої роботи нами було обрано таке розведення проб: для сусла — у 1 000 разів, для сухих вин — у 250 разів, для всіх інших

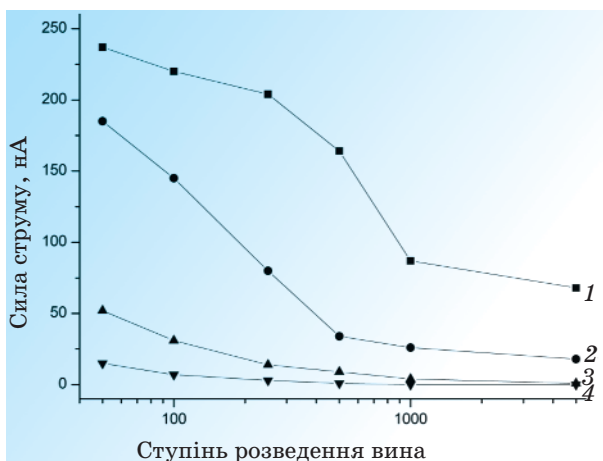


Рис. 7. Відгуки амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої в парах ГА глюкозооксидази на внесення в електрохімічну комірку різних аліквот сусла білого (крива 1, 125 г/л глюкози) та вина: портвейн білий (крива 2, 33 г/л глюкози), мадера (крива 3, 7 г/л глюкози), аліготе (крива 4, 0,12 г/л глюкози). Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

використаних вин — у 500 разів. Варто зазначити, що максимально можливий вміст основних інтерферуючих речовин у суслі та вині, розведених у 500 разів, такий [3]: етанол — до 7 мМ, гліцерол — до 0,25 мМ, лактат — до 0,1 мМ, аскорбінова кислота — до 0,005 мМ, а, як свідчать результати, наведені на рис. 5, біосенсор на основі ГОД, іммобілізованої в ГА, є зовсім не чутливим до цих речовин у наведених концентраціях.

Для визначення вмісту глюкози у винах за допомогою амперометричного біосенсора застосовували метод стандартних додавань. Для цього спочатку отримували відгук біосенсора на внесення в електрохімічну комірку пробі вина, що аналізується. Потім до ідентичних об'ємів вина додавали стандартні розчини глюкози з певними концентраціями та реєстрували сигнали датчика на внесення цих сумішей. Після здійснення серії послідовних аналізів (з використанням стандартних розчинів з різною концентрацією глюкози) отримували набір точок — пряму лінію, яка після екстраполяції на вісь абсцис відсікала на ній значення концентрації глюкози у пробі аналізованого вина. З рис. 8 видно, що вміст глюкози в комірці в разі внесення розведеної у 250 разів пробі вина аліготе становив 9,6 мкМ, розведених у 500 разів проб вин мадера та портвейн білий — 84 та 351 мкМ відповідно, розведеної у 1 000 разів пробі сусла білого — 694 мкМ. Це означає, що в цих винах та виноматеріалі концентрація глюкози така: 0,43 г/л (2,4 мМ) для аліготе, 7,56 г/л (42 мМ) для мадери, 31,6 г/л (176 мМ) для портвейну білого та 124,9 г/л (694 мМ) для сусла білого.

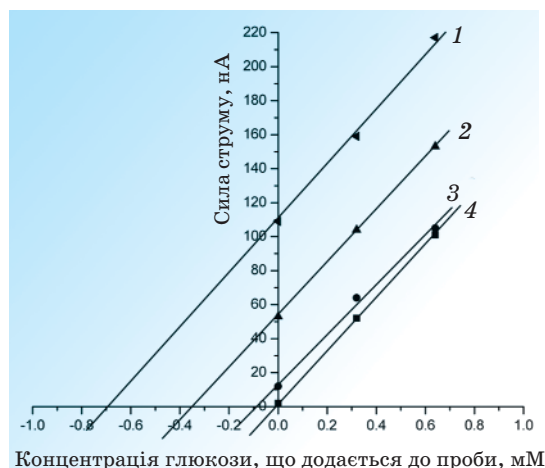


Рис. 8. Визначення концентрації глюкози в білому суслі (1) та у зразках вина портвейн білий (2), мадера (3) та аліготе (4) за допомогою методу стандартних додавань. Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

Наступним етапом роботи було порівняння результатів аналізу глюкози у виноматеріалі, одержаних за допомогою біосенсора, із даними традиційного методу аналізу — високоефективної рідинної хроматографії. Як об'єкт дослідження було використано 12 проб вина різного типу та 2 проби білого й червоного сусла. Отримані дані наведено в таблиці. Слід відзначити високу кореляцію між результатами, одержаними із використанням амперометричного біосенсора та класичного хроматографічного методу визначення глюкози. Деяка розбіжність між даними ВЕРХ та біосенсора спостерігається лише в разі аналізу сухих вин, концентрація глюкози в яких є надто малою.

Урешті-решт, було досліджено відтворюваність відгуків та операційну стабільність створеного глюкозного біосенсора та показано, що через 8 год безперервної роботи біосенсор демонструє дещо більші, порівняно з початковими відгуками, сигнали на додавання розчину глюкози (рис. 9). Зростання відгуку біосенсора протягом першої доби після іммобілізації ГОД у парах ГА можна пояснити тим, що молекули ензиму поступово набувають найбільш оптимальної для їх функціонування конформації у мембрані [10]. А з додаванням у комірку проби вина відгук зменшився на 13% від початкового через 8 год безперервної роботи сенсора.

Також було вивчено стабільність глюкозного амперометричного біосенсора під час зберігання його в сухому стані при + 4 °С. Наведені на рис. 10 дані свідчать, що через 2 місяці після іммобілізації ГОД залишається

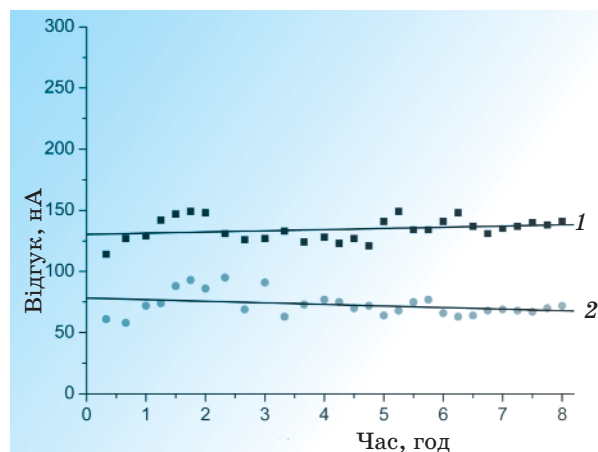


Рис. 9. Дослідження відтворюваності відгуків та операційної стабільності амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої у парах ГА глюкозооксидази. Концентрація глюкози, що додається в електрохімічну комірку, — 1,3 мМ (1), проба вина — 10 мкл (2).

Вимірювання проводили в 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

близько 100% від початкової активності ензиму, а потім величина відгуку починає поступово зменшуватися. Такий ефект можна пояснити тим, що зниження активності ГОД протягом перших двох місяців зберігання не призводить до зменшення величини відгуку біосенсора, оскільки ензим у чутливій мембрані перебуває в надлишку і на каталіз ензиматичної реакції вистачає навіть його зменшеної активності. Подальше ж падіння активності ГОД нижче того рівня, який забезпечував повне розщеплення субстрату, спричинює поступове падіння активності біосенсора.

Концентрація глюкози у 12 зразках вина та у 2 зразках виноградного сусла, визначена за допомогою біосенсора та методу високоефективної рідинної хроматографії

Проба	Тип	Концентрація глюкози, г/л	
		Біосенсор	ВЕРХ
Ркацителі «Коктебель»	Біле, столове, сухе	0,63±0,1	0,29
Аліготе «Коктебель»	Біле, столове, сухе	0,47±0,05	0,12
Мерло «Коблево»	Червоне, столове, сухе	0,84±0,05	0,51
Каберне «Коктебель»	Червоне, столове, сухе	0,70±0,05	0,32
Монте Блан «Коктебель»	Біле, столове, напівсолодке	16,70±0,3	16,40
Портвейн 777 червоний	Червоне, міцне	32,76±0,2	34,54
Портвейн 777 рожевий	Рожеве, міцне	32,22±0,2	33,24
Портвейн білий	Біле, міцне	31,50±0,1	32,78
Мадера «Масандра»	Біле, міцне	7,56±0,15	7,15
Кокур «Коктебель»	Біле, десертне	87,18±0,3	87,12
Кара-Даг «Коктебель»	Червоне, десертне	85,32±0,6	83,05
Кагор український	Червоне, десертне	87,30±0,4	87,18
Сусло біле	—	125,28±0,25	124,99
Сусло червоне	—	131,31±0,6	134,54

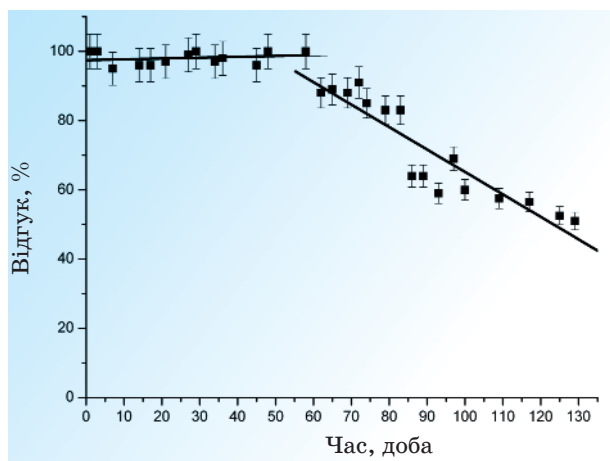


Рис. 10. Залежність величини відгуку амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої у парах ГА глюкозооксидази від часу зберігання при + 4 °С у сухому стані. Концентрація глюкози, що додається в електрохімічну комірку, — 5 мМ. Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, потенціал +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

Таким чином, у ході роботи відпрацьовано методику визначення вмісту глюкози у вині за допомогою амперометричного біосенсора на основі платинового друкованого електрода SensLab та глюкозооксидази. Досліджено селективність амперометричних біосенсорів, розроблених із застосуванням двох різних методів іммобілізації глюкозооксидази. Показано, що датчик на основі ГОД, іммобілізованої у парах глутарового альдегіду, є селективним і не демон-

струє неспецифічного відгуку на основні компоненти вина, на відміну від біосенсора з ГОД, іммобілізованою у полімері ПЕДТ. Вивчено відтворюваність відгуків та операційну стабільність створеного датчика на основі іммобілізованої у парах глутарового альдегіду ГОД та досліджено його стабільність під час зберігання. За допомогою розробленого біосенсора проведено аналіз концентрації глюкози у винах різного типу та в суслі. Показано високу кореляцію результатів, отриманих за допомогою глюкозного амперометричного біосенсора, із даними традиційного методу аналізу глюкози — високоефективної рідинної хроматографії. Крім того, у ході роботи встановлено, що біосенсор з іммобілізованою у полімері ПЕДТ ГОД виявляє надзвичайно широкий динамічний діапазон роботи (до 50 мМ глюкози) і може бути успішно застосований для аналізу глюкози в середовищах, що не містять етанолу та гліцеролу, наприклад у крові.

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

ЛІТЕРАТУРА

1. Wu B., Zhang G., Shuang S. Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane // *Talanta*. — 2004. — V. 64. — P. 546–553.
2. Niculescu M., Mieliauskienė R., Laurinavicius V., Csooregi E. Simultaneous detection of ethanol, glucose and glycerol in wines using pyrrolo-quinoline quinone-dependent dehydrogenases based biosensors // *Food Chemistry*. — 2003. — V. 82. — P. 481–489.
3. Горюшкіна Т. Б., Дзядевич С. В. Виноградні вина. Хімічний склад та методи визначення // *Біотехнологія*. — 2008. — Т. 1, №2. — С. 24–38.
4. Niculescu M., Erichsen T., Sukharev V. et al. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenase-based reagentless amperometric biosensor for ethanol monitoring during wine fermentation // *Anal. Chim. Acta*. — 2002. — V. 463, №1. — P. 39–51.
5. Шольц Е. П., Пономарев В. Ф. Технологія переробки винограда. — М.: Агропромиздат, 1990. — 447 с.
6. Office International de la Vigne et du Vin (OIV). Recueil des methods internationales d'analyse des vine et des mouts. — Paris: OIV, 2006. — 321 p.
7. Горюшкіна Т. Б., Дзядевич С. В. Ферментні біосенсори для кількісного аналізу компонентів вина // *СЕМСТ*. — 2008, №1. — С. 49–67.
8. Шкотова Л. В., Солдаткин А. П., Дзядевич С. В. Адаптація амперометричного ферментного біосенсора для аналізу глюкози в винах // *Укр. біохім. журн.* — 2004. — Т. 76, № 3. — С. 114–121.

9. *Antiochia R., Gorton L.* Development of a carbon nanotube paste electrode osmium polymer-mediated biosensor for determination of glucose in alcoholic beverages // *Biosens. and Bioelectr.* — 2007. — V. 22. — P. 2611–2617.
10. *Razumiene J., Vilkanauskyste A., Gureviciene V. et al.* New bioorganometallic ferrocene derivatives as efficient mediators for glucose and ethanol biosensors based on PQQ-dependent dehydrogenases // *J. of Organomet. Chem.* — 2003. — V. 668. — P. 83–90.
11. *Laurinavicius V., Razumiene J., Kurtinaitiene B. et al.* Bioelectrochemical application of some PQQ-dependent enzymes // *Bioelectrochemistry.* — 2002. — V. 55. — P. 29–32.
12. *Alkasrawi M., Popescu I.C., Laurinavicius V. et al.* A redox hydrogel integrated PQQ-glucose dehydrogenase based glucose electrode // *Anal. Commun.* — 1999. — V. 36. — P. 395–398.
13. *Miertus S., Katrliik J., Pizzariello A. et al.* Amperometric biosensors based on solid binding matrices applied in food quality monitoring // *Biosens. and Bioelectr.* — 1998. — V. 13, N7–8. — P. 911–923.
14. *Guzman-Vaazquez de Prada A., Penna N., Parrado C. et al.* Amperometric multidetection with composite enzyme electrodes // *Talanta.* — 2004. — V. 62. — P. 896–903.
15. *Gonzalo-Ruiz J., Alonso-Lomillo M. A., Munnoz F. J.* Screen-printed biosensors for glucose determination in grape juice // *Biosens. and Bioelectr.* — 2007. — V. 22. — P. 1517–1521.
16. *De Corcuera J. I. R., Cavalieri R. P., Powers J. R.* Improved platinization conditions produce a 60-fold increase in sensitivity of amperometric biosensors using glucose oxidase immobilized in poly-o-phenylenediamine // *J. of Electroanal. Chem.* — 2005. — V. 575. — P. 229–241.
17. *Florescu M., Bretta C. M. A.* Development and evaluation of electrochemical glucose enzyme biosensors based on carbon film electrodes // *Talanta.* — 2005. — V. 65. — P. 306–312.
18. *Zhao M., Hibbert D. B., Gooding J. J.* An oxygen-rich fill-and-flow channel biosensor // *Biosens. and Bioelectron.* — 2003. — V. 18. — P. 827–833.
19. *Yang X., Zhou Z., Xiao D., Choi M. M. F.* A fluorescent glucose biosensor based on immobilized glucose oxidase on bamboo inner shell membrane // *Ibid.* — 2006. — V. 21. — P. 1613–1620.
20. *De Luca S., Florescu M., Ghica M. E. et al.* Carbon film electrodes for oxidase-based enzyme sensors in food analysis // *Talanta.* — 2005. — V. 68. — P. 171–178.
21. *Бережецький А. Л., Щувайло О. М., Архипова В. М. та ін.* Дослідження та оптимізація різних перетворювачів для створення амперометричних біосенсорів // *Sens. Electron. and Microsyst. Technol.* — 2005. — №2. — С. 55–62.
22. *Шкотова Л. В., Горюшкіна Т. Б., Сластия Є. А. та ін.* Амперометричний біосенсор для аналізу лактату у вині та у виноградному суслі у процесі його ферментації // *Укр. біохім. журн.* — 2005. — Т. 77, №5. — С. 123–130.
23. *Azevedo A. M., Prazeres M. F., Cabral J. M. S., Fonseca L. P.* Ethanol biosensors based on alcohol oxidase // *Biosens. and Bioelectron.* — 2005. — V. 21. — P. 235–247.
24. *Горюшкіна Т. Б., Шкотова Л. В., Сластия Є. А. та ін.* Оптимізація методики визначення лактату у виноматеріалі амперометричним ферментним біосенсором // *СЕМСТ.* — 2008, №2. — С. 39–47.

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ
ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ
ГЛЮКОЗЫ В ВИНМАТЕРИАЛЕ
ЭНЗИМНЫМ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ
БИОСЕНСОРОМ**

*Т. Б. Горюшкіна^{1, 2}, Е. В. Остроухова³,
А. П. Солдаткин¹, С. В. Дзядевич¹*

¹Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет
имени Тараса Шевченко

³Национальный институт винограда и вина
«Магарач», Ялта

E-mail: tatiana_goryushkina@yahoo.com

Отработана методика определения глюкозы в вине с помощью амперометрического биосенсора на основе платинового печатного электрода SensLab и глюкозооксидазы (ГОД). Исследована селективность биосенсоров, разработанных с применением двух разных методов иммобилизации ГОД. Показано, что датчик на основе ГОД, иммобилизованной в парах глутарового альдегида (ГА), не дает отклика на основные интерферирующие вещества вина, в отличие от биосенсора с ГОД, иммобилизованной в полимере поли-(3,4-этилендиокситиофен) (ПЭДТ). Изучены операционная стабильность созданного датчика на основе иммобилизованной в парах ГА ГОД и его стабильность при хранении. С помощью разработанного биосенсора проведен анализ концентрации глюкозы в винах разного типа и в сусле. Показана высокая корреляция полученных результатов с данными высокоэффективной жидкостной хроматографии. Установлено, что биосенсор с иммобилизованной в полимере ПЭДТ ГОД обладает чрезвычайно широким динамическим диапазоном работы и может быть успешно применен для анализа глюкозы в средах, не содержащих этанол и глицерол, например в крови.

Ключевые слова: амперометрический биосенсор, глюкоза, вино, сусло.

**OPTIMIZATION OF METHODS
OF GLUCOSE CONTENT DETERMINATION
IN WINE BY ENZYME
AMPEROMETRIC BIOSENSOR**

*T. B. Goriushkina^{1, 2}, O. V. Ostroukhova³,
O. P. Soldatkin¹, S. V. Dzyadevych¹*

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

²Taras Shevchenko National University, Kyiv

³Institute for Vine and Wine «Magarach»,
Yalta

E-mail: tatiana_goryushkina@yahoo.com

A method of glucose determination in wine by an amperometric biosensor on the basis of platinum printed electrode SensLab and glucose oxidase was optimized. Selectivity of glucose biosensors created on the basis of two different methods of glucose oxidase immobilization was investigated. Main wine interferences were demonstrated to have no effect on work of the biosensor with glucose oxidase immobilised in glutaraldehyde vapor, but they influenced on work of the biosensor with glucose oxidase immobilised in PEDT polymer. Reproducibility, operational and storage stability of the created biosensor on the basis of glucose oxidase immobilised in glutaraldehyde vapor were investigated. Glucose concentration in several types of wine and must was determined with the created biosensor, and the results were compared with those obtained by traditional analytical method — HPLC. Good correlation between data obtained by the biosensor method and HPLC was shown. It was also determined that biosensor with glucose oxidase in PEDT polymer is characterized by extremely wide dynamic range of work and it can be successfully used for glucose analysis in the liquids without ethanol and glycerol — for example, in blood.

Key words: amperometric biosensor, glucose, wine, must.