

ТРАДИЦІЙНІ ТА БІОСЕНСОРНІ МЕТОДИ ВИЗНАЧЕННЯ МОНО- І ДИСАХАРИДІВ

В. М. ПЄШКОВА^{1,2}, О. Я. САЯПІНА¹, О. О. СОЛДАТКІН¹, С. В. ДЗЯДЕВИЧ¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка

E-mail: victoriya.p@gmail.com

В огляді описано найважливіші моно- та дисахариди, їхні фізико-хімічні властивості та застосування у харчовій промисловості. Проведено аналіз класичних методів якісного та кількісного визначення моно- та дисахаридів, виокремлено недоліки та переваги кожного із методів. Розглянуто переваги існуючих біосенсорів для визначення вуглеводів порівняно з традиційними методами аналізу.

Ключові слова: вуглеводи, традиційні методи визначення, біосенсори.

Організація належного контролю вмісту моно- та дисахаридів на різних етапах виробничого процесу є важливим завданням у різних галузях виробництва: харчовій промисловості (цукрове, молочне виробництво, пивоваріння, виноробство), сільському господарстві, фармацевтичному виробництві тощо.

У сільському господарстві вміст сахарози в цукровому буряку є одним із показників, який визначає ефективність технологічного процесу на всіх етапах — від вирощування буряка і його зберігання до повної переробки і виробництва цукру. У молочному виробництві вміст лактози — одного з основних компонентів молока та молочних продуктів — є показником якості. Величезне значення в харчовій промисловості відіграє також мальтоза, вміст якої в мальтозній патоці визначає якість кінцевого продукту виробництва (пива, квасу тощо). Фруктозу, мальтозу, та інші моно- та дисахариди часто використовують як замітники сахарози у виробництві цілої низки продуктів. Інформація про наявність та концентрацію цих вуглеводів у напоях і продуктах харчування є важливим показником якості останніх.

На сьогодні існує багато різноманітних методів визначення вуглеводів, але кожен із них має певні недоліки, деякі — потребують наявності кваліфікованого персоналу та

складного і дорогого обладнання, інші є простими і швидкими, але менш точними та селективними. Одним із перспективних шляхів реалізації аналітичної апаратури на цей час є використання біосенсорних технологій.

У цьому огляді наведено дані про найважливіші моно- та дисахариди, описуються та порівнюються традиційні й біосенсорні методи їх визначення.

Найважливіші моно- та дисахариди

Серед великої кількості моносахаридів найпоширенішими у природі є глюкоза, фруктоза, галактоза та маноза, серед дисахаридів найчастіше зустрічаються сахароза, лактоза та мальтоза.

Глюкоза ($C_6H_{12}O_6$) — виноградний цукор, декстроза, солодкий на смак моносахарид, що належить до групи альдогексоз. У живих організмах глюкоза міститься як у вільному стані, так і у вигляді ефірів фосфорної кислоти. Її залишок входить до складу багатьох олігосахаридів (сахарози, лактози та ін.), полісахаридів (крохмалю, глікогену, целюлози та ін.), глікопротеїнів, гліколіпідів, ліпополісахаридів та глікозидів. У природі трапляється лише D-глюкоза, яку виділено у вигляді двох аномерів: α - і β -глюкопіранози. Найбільш стійкий таутомер — β -D-глюкопіраноза в конформації крісла [1]. Глюкозу

використовують у кондитерській промисловості, хлібопеченні, виробництві фруктових консервів, заморожених фруктів, морозива, алкогольних та безалкогольних напоїв.

Фруктоза (плодовий цукор) є кетогексозою. Вона в 2,5 рази солодша за глюкозу та в 1,7 — за сахарозу. Фосфорні ефіри фруктози є проміжними продуктами вуглеводного обміну. Фруктозу застосовують у харчовій промисловості в основному як замітник сахарози [1].

Сахароза — буряковий або тростинний цукор (α -глюкопіранозил-1,2- β -фруктофуранозид), належить до дисахаридів типу глікозидо-глікозидів. Він складається з α -D-глюкози та β -D-фруктози, з'єднаних між собою напівацетальними гідроксилами. На відміну від більшості дисахаридів сахароза не є редукуючим вуглеводом, оскільки не має у своєму складі вільного напівацетального гідроксила. Багато сахарози міститься в стеблах, корінні, бульбах і плодах рослин. У коренеплодах цукрових буряків її накопичується до 24%, у стеблах цукрової тростини — близько 20%. Сахарозу широко застосовують у харчовій промисловості (хлібопекарська, кондитерська промисловість, консервування) [1].

Лактоза — молочний цукор (β -галактопіранозил-1,4- α -глюкопіраноза), складається з глюкози та β -галактози, має відновні властивості. Лактоза є важливим вуглеводним компонентом молока ссавців. У молоці корови вміст лактози становить близько 4,5%, а в жіночому молоці — до 7,5%. У тонкому кишечнику людей і тварин лактоза розщеплюється на глюкозу й галактозу під дією ензиму лактази (β -галактозидази). Зниження активності лактази в організмі людини призводить до появи хвороби (лактазна недостатність), клінічним проявом якої є інтолерантність до лактози [1].

Для кисломолочних бактерій лактоза є основним джерелом енергії, що зумовлює молочнокисле бродіння, в результаті якого отримують багато кисломолочних продуктів. Лактозу широко застосовують у мікробіології, аналітичній хімії, харчовій промисловості (хлібопекарська, молочна, м'ясна, кондитерська промисловість), фармацевтичній промисловості (виробництво медичних препаратів, антибіотиків) тощо. Лактозу інтенсивно використовують у виробництві дитячого харчування, заміників жіночого молока та діабетичних продуктів. Її також застосовують у виробництві смакових та ароматичних добавок.

Мальтоза — солодовий цукор (α -глюкопіранозил-1,4- α -глюкопіраноза), належить до дисахаридів типу глікозидо-глюкоз, складається з двох залишків молекул глюкози та має відновні властивості, оскільки зв'язок між молекулами утворюється за рахунок взаємодії напівацетального гідроксила однієї молекули глюкози і здебільшого спиртового гідроксила, який міститься біля четвертого атома вуглецю другої глюкози, унаслідок чого один напівацетальний гідроксил залишається вільним.

Мальтоза у великій кількості є в пророслих зернах (солоді) ячменю, жита та інших зернових, а також входить до складу пива, меду та меляси. Вона є проміжним продуктом розпаду полісахаридів (крохмалю та глікогену) під дією ензимів амілаз. Мальтоза також може існувати у β -формі (α -глюкопіранозил-1,4- β -глюкопіраноза), її водні розчини мутаротують. Розщеплення мальтози до двох молекул глюкози відбувається під дією ензиму мальтази (α -глюкозидази), який присутній у травному соку тварин та людини, пророслому зерні, цвілевих грибах та дріжджах. Генетично обумовлена відсутність цього ензиму в слизовій оболонці кишечника людини призводить до вродженої інтолерантності до мальтози — тяжкого захворювання, що потребує виключення із раціону мальтози, крохмалю та глікогену й додавання до їжі ензиму мальтази. Мальтозу використовують як замітник сахарози в харчовій промисловості. Також її застосовують у мікробіології, у виробництві різних видів напоїв, дієтичного, дитячого й спортивного харчування, у хлібопеченні, виробництві пива й квасу [1].

Традиційні методи визначення моно- та дисахаридів

Існує чимала кількість традиційних методів якісного й кількісного аналізу моно- та дисахаридів у харчових продуктах. До них належать хімічні, фізичні, ензиматичні, хроматографічні методи тощо. Багато із цих методів використовують у комплексі [2–5].

Хроматографічні методи. Для ідентифікації вуглеводів застосовують тонкошарову, газорідну хроматографію з мас-спектрометрією та високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ). ЯМР-спектрометрією ідентифікують хімічну структуру вуглеводів. У методі ВЕРХ для збільшення роздільної здатності використовують дрібнозернисті однорідні сорбенти, а елюент подається у колонку під тиском. Метод дозволяє

проводити кількісне визначення вуглеводів з мінімальною концентрацією 0,12–0,4 г/л для фруктози та 0,18–0,6 г/л для глюкози. Перевагами методу ВЕРХ є великий діапазон молекулярних мас речовин, з якими можна працювати. ВЕРХ є найбільш специфічним, чутливим та точним хроматографічним методом визначення концентрації вуглеводів [2–5]. Недоліками ВЕРХ є висока вартість обладнання та складність аналізу.

У разі використання тонкошарової хроматографії для визначення вмісту вуглеводів пластинку з тонким шаром пористого носія, на нижній край якої нанесено розчини вуглеводів, ставлять у розчинник, який, переміщуючись за рахунок капілярних сил вгору по пластинці, переміщує вуглеводи. Після закінчення хроматографії пластинку висушують та обприскують розчином нафторезорцину для виявлення плям вуглеводів. Плями глюкози та галактози набувають синьо-фіолетового забарвлення, фруктози — червоно-чорного, сахарози та мальтози — червоного, лактози — червоно-фіолетового. Концентрацію розділених вуглеводів визначають за площею хроматографічної зони. Перевага методу тонкошарової хроматографії полягає в тому, що він є дешевим та простим для здійснення якісного аналізу і дозволяє одночасно досліджувати декілька проб. До недоліків методу належать висока трудомісткість і тривалість аналізу (30–90 хв) у разі кількісного визначення речовин [2].

Основним недоліком усіх хроматографічних методів є необхідність у попередній підготовці проби до аналізу, яка полягає в екстрагуванні, фільтруванні та центрифугуванні речовин, що їх визначають [4].

Електрофоретичні методи. До складу вуглеводів входять іонізуючі групи, тому в розчині вони можуть існувати в зарядженій формі у вигляді катіонів або аніонів. Швидкість руху катіонів до катода чи аніонів до анода залежить від співвідношення між рушійною силою електричного поля, що діє на заряджені іони, та силами взаємодії між молекулами і навколишнім середовищем, в основному це — електростатичні сили та сили тертя, які уповільнюють рух заряджених молекул [3]. Електрофорез успішно застосовується для визначення моносахаридів, у молекулі яких є основні (аміноцукри) або кислі групи (альдонові, уронові цукри тощо). У тих випадках, коли є потреба розділити нейтральні моносахариди, використовують їхню здатність утворювати від'ємно заряджені комплекси з бор-

ною кислотою чи її солями, з молібдатами, вольфраматами та низкою інших неорганічних аніонів.

Імуноаналіз. Для кількісного визначення вуглеводів можна застосовувати радіоімуноаналіз (RIA), хемілюмінесцентний імуноаналіз, імуноензимний аналіз (IEA), одним із різновидів якого є ензимний імуносорбентний аналіз (ELISA), тощо. За допомогою імунологічних методів можна проводити якісний та кількісний аналіз вуглеводів у розчині. Для отримання специфічних антитіл до необхідних вуглеводів слід сполучити ці вуглеводи з протеїном та провести імунізацію тварини, яка потім продукуватиме антитіла у відповідь на внесений глікопротеїн. Імуноаналіз є чутливим, специфічним та швидким методом [3].

Поляриметрія. Розчини вуглеводів є оптично активними і можуть обертати площину поляризованого світла, при цьому величина кута обертання пропорційна концентрації вуглеводів у розчині. Для рівноважних розчинів сахарози $[\alpha]_D^{20}$ становить $+66,53^\circ$; для лактози $+52,6^\circ$; фруктози $-92,4^\circ$; глюкози $+52,8^\circ$; лактулози $+51,6^\circ$; лактобіонової кислоти $+22,8^\circ$. Як правило, поляриметри використовують для визначення концентрації лактози, глюкози, сахарози. Цей метод малоспецифічний і неточний, але достатньо простий та дешевий [3, 5–7].

Рефрактометрія. Здатність речовин заломлювати промінь світла характеризується показником заломлення (рефрактерний індекс), який залежить від природи речовини та її концентрації у розчині. Концентрація вуглеводів у розчині прямо пропорційна величині рефрактерного індексу розчину вуглеводів [3]. Рефрактометрію використовують на виробництві для визначення концентрації цукру в сиропі, меді, мелясі, томатних продуктах та джемі. У молочній промисловості застосовують рефрактометр для визначення лактози в молоці. Загалом, рефрактометричний метод швидкий і простий у виконанні, відносно недорогий, але недостатньо специфічний і точний [5, 7].

Визначення густини. Густина розчину вуглеводів прямо пропорційно залежить від їх концентрації у зразку. На практиці густину розчину визначають за допомогою пікнометра або гідроскопічних терезів. Цей метод широко застосовують у харчовому виробництві для визначення загальної концентрації вуглеводів у соках та напоях [3].

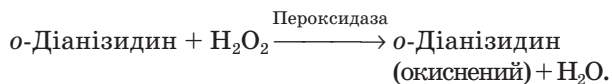
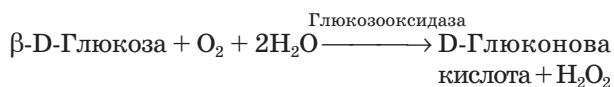
Спектрофотометрія. Речовини поглинають промені світла певної довжини хвилі залежно від вібрацій та обертання різних

груп молекул. Величина поглинання залежить від типу та концентрації речовини, а також від довжини хвилі світла. Вуглеводи адсорбують ІЧ-промені на певній довжині хвилі, на якій не адсорбують інші основні компоненти харчових продуктів, такі як протеїни та ліпіди [2]. Концентрацію лактози можна визначати за допомогою інфрачервоних аналізаторів молока Мілко-Скан фірми Foss Electric (Данія), «Аналікон» (Росія), ультразвукових аналізаторів «Лактан» (Росія) тощо [7]. Спектрофотометри можна використовувати як для кількісного аналізу, так і для визначення спектрів поглинання вуглеводів.

Ензиматичні методи. Вуглеводи, як правило, не поглинають світло у видимій та УФ-області світла, але за допомогою специфічного до даного вуглеводу ензиму можна провести реакцію, у результаті якої одержують забарвлену речовину, яка далі визначається за інтенсивністю поглинання світла за певної довжини хвилі у видимій чи УФ-області [3–5].

Глюкозооксидазний метод

Для визначення глюкози в досліджуваному розчині проводять дві послідовні реакції:



У першій реакції використовується ензим глюкозооксидаза, який є високоспецифічним стосовно $\beta\text{-D-глюкози}$. У водних розчинах глюкоза міститься в $\alpha\text{-}$ (36%) та $\beta\text{-}$ формі (64%). Деякі зразки глюкозооксидази містять мутаротазу, яка забезпечує перетворення $\alpha\text{-глюкози}$ на $\beta\text{-глюкозу}$. За відсутності мутаротазу слід збільшувати час інкубації, що сприяє самовільному переходу $\alpha\text{-форми}$ у $\beta\text{-форму}$.

У другій реакції ензим пероксидаза за присутності пероксиду водню окиснює хромогенний барвник типу *o*-діанізидину, що приводить до утворення продукту, інтенсивність забарвлення якого пропорційна вмісту глюкози в розчині. Після закінчення реакції кількість утвореної забарвленої речовини, яка прямо пропорційна вихідній концентрації глюкози, можна визначити колориметрично за довжини хвилі 400 нм.

Пероксидазна реакція є менш специфічною і більш вибагливою порівняно з глюкозооксидазною. Багато речовин (сечова кис-

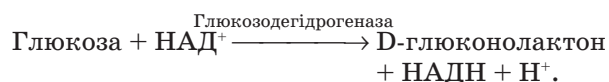
лота, аскорбінова кислота, білірубін, гемоглобін, тетрацикліни, глутатіон) призводять до зниження результатів, конкуруючи з хромогеном за H_2O_2 . Більшої частини інтерферуючих речовин можна позбутися осадженням за Somogy [8], однак це ускладнює процедуру аналізу.

Як хромогенний кисневий акцептор можна використовувати також *o*-толідин, який у пероксидазній реакції окиснюється пероксидом водню з утворенням забарвленої у синій колір сполуки. Екстинкцію досліджуваного розчину вимірюють колориметрично, використовуючи червоний світлофільтр (640 нм) [4, 8].

Дегідрогеназний метод

1. Визначення глюкози

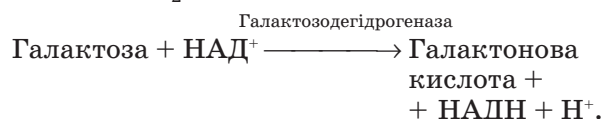
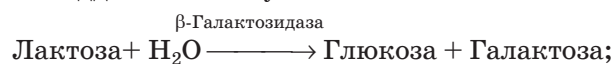
Ензим глюкозодегідрогеназа каталізує окиснення глюкози до глюконолактону:



Для того, щоб пришвидшити перетворення $\alpha\text{-глюкози}$ на $\beta\text{-форму}$ в реакційне середовище додають ензим мутаротазу. Кількість утвореного НАДН пропорційна концентрації глюкози в досліджуваному зразку. Швидкість реакції контролюється при 340 нм у кінетичному варіанті чи варіанті фіксованого часу інкубації.

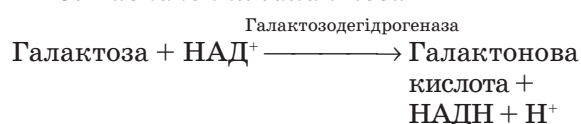
2. Визначення лактози

Очищений екстракт досліджуваної проби піддають впливу ензимів:



НАДН визначають за спектральною поглинальною здатністю при довжині хвилі 340 нм. Вміст лактози пропорційний кількості НАДН за умови, що зроблено поправку на галактозу, яка була наявна в початковій досліджуваній пробі [9, 10].

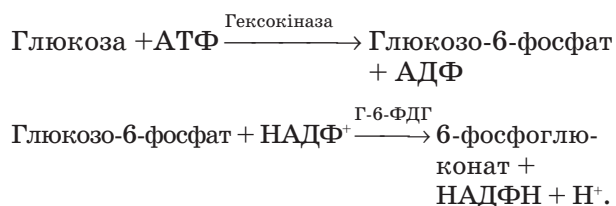
3. Визначення галактози



Як і в попередньому випадку, НАДН визначають за спектральною поглинальною здатністю при довжині хвилі 340 нм.

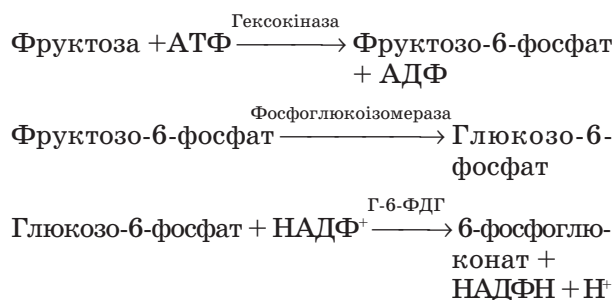
*Гексокіназний метод***1. Визначення глюкози**

Глюкоза під дією гексокінази (ГК) за участю АТФ перетворюється на глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф), який під дією глюкозо-6-фосфатдегідрогенази (Г-6-ФДГ) перетворюється на 6-фосфоглюконо-D-лактон. Кількість НАДФН, що утворилася під час цієї реакції, пропорційна кількості глюкози в розчині й може бути визначена за світлопоглинанням за довжини хвилі 340 нм. У разі використання Г-6-ФДГ з дріжджів коензимом є НАДФ⁺. НАДФ⁺ як коензим застосовують у випадку бактеріальної Г-6-ФДГ (*Leuconostoc mesenteroides*).



Після закінчення реакції НАДФН визначають спектрофотометрично за довжини хвилі 340 нм. Ензиматичним методом можна визначати концентрацію глюкози від 0,002 г/л. Фруктоза може заважати визначенню глюкози. Концентрацію глюкози можна розрахувати, виходячи зі значення коефіцієнта молярного поглинання НАДФН або НАДН. Перевагу віддають використанню калібрувальних розчинів із відомим вмістом глюкози. Лінійна залежність між поглинанням і концентрацією глюкози зберігається до 27,7 ммоль/л. Метод має високу чутливість та специфічність.

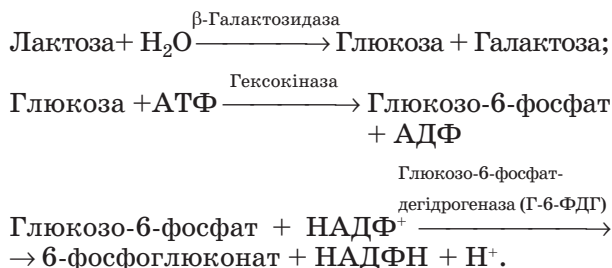
Уведення в систему переносника протонів феназинметосульфату (ФМС) і акцептора — тетразолію — дозволяє проводити визначення у видимій області спектра, тому що утворюваний формаган має максимум поглинання при 520 нм. У деяких автоматизованих системах використовують іммобілізовану гексокіназу та Г-6-ФДГ, що значно зменшує затрати на визначення [5, 8].

2. Визначення фруктози

Як і в попередньому випадку, НАДФН визначають спектрофотометрично за довжини хвилі 340 нм [8].

3. Визначення лактози

Очищений від протеїнів екстракт досліджуваної проби піддають впливу таких ензимів та біохімічних реагентів:



НАДФН визначають спектрофотометрично за довжини хвилі 340 нм. Вміст лактози пропорційний кількості НАДФН за умови, що зроблено поправку на глюкозу, наявну у початковій досліджуваній пробі [9].

Хімічні методи. В основі більшості хімічних методів визначення вуглеводів лежить здатність вуглеводів при окисненні відновлювати ряд речовин, утворюючи в ході реакції осад певного кольору. Наприклад, за методом Бенедикта (Фелінга, Гайнеса, Троммера) вуглеводи відновлюють при нагріванні в лужному середовищі гідроксид міді (II) синього кольору до оксиду міді (I) жовто-червоного кольору, а за методом Ніландера нітрат гідроксиду вісмуту — до чорного металічного вісмуту. За допомогою цих реакцій можна проводити якісний аналіз вуглеводів. У разі поєднання хімічного та спектрофотометричного методів можна здійснювати кількісний аналіз вуглеводів, визначаючи колориметрично забарвлені продукти, що утворюються в ході хімічних реакцій, кількість яких пропорційна концентрації вихідної досліджуваної речовини. Для кількісного визначення вуглеводів у деяких випадках проводять титрування. Хімічні методи є трудомісткими та недостатньо селективними [11].

Ваговий (гравіметричний) метод.

Принцип методу полягає в здатності цукрів, що мають вільні альдегідні та кетонні групи (глюкоза, фруктоза), у певних умовах відновлювати лужні розчини оксиду міді (II). Оксид міді (I), що утворився при цьому, можна визначати масовими чи об'ємними методами. Метод дає хороші результати за вмісту глюкози в досліджуваному розчині від 10 до 90 мг. Однак гравіметричний метод є недостатньо точним та селективним.

Біосенсорні методи визначення

Останнім часом дедалі більшої актуальності набуває біосенсорика. У 2003 р. сумарний світовий ринок продажу біосенсорів становив 7,2 млрд. доларів США із прогнозом приросту на 10–14% упродовж наступних восьми років. Біосенсорні технології активно використовують у біохімії та молекулярній біології. Розроблення хімічних та біохімічних сенсорів належить до напрямів, що визначають розвиток сучасної аналітичної хімії. Основна відмінність сенсорних технологій від традиційних підходів інструментального аналізу — їх орієнтація на отримання кінцевого продукту — сенсора, що дозволяє проводити якісний та кількісний аналіз у реальному масштабі часу та з мінімальною додатковою пробопідготовкою. Досягнення в нанотехнології дозволили створювати мініатюрні багатофункціональні біосенсори, біочипи. Порівняно із традиційними методами аналізу добре налагоджений біосенсорний метод може мати ряд важливих переваг, таких як простота, швидкість аналізу, низька вартість, висока чутливість та селективність [12].

Останнім часом з'являється дедалі більше нових розробок біосенсорів для визначення вуглеводів. Деякі лабораторні прототиби біосенсорів для визначення різних вуглеводів подано в таблиці.

Біосенсори для визначення глюкози

Після іммобілізації глюкозооксидази у складі мембрани з невеликим розміром пор і її розміщення на поверхні робочого електрода система починає функціонувати як біосенсор для визначення глюкози. Під дією ензиму глюкозооксидази глюкоза окиснюється з утворенням пероксиду водню та D-глюконолактону. Глюконолактон спонтанно гідролізується до глюконової кислоти, яка дисоціює на залишок кислоти і протон. Це, у свою чергу, спричинює зміну провідності, яку можна реєструвати за допомогою кондуктометричного перетворювача. Протони, що утворюються в результаті цієї самої реакції, можна реєструвати також за допомогою потенціометричного перетворювача. У разі амперометричного визначення утворений у процесі глюкозооксидазної реакції пероксид водню відновлюється на аноді, що приводить до збільшення сили струму. Струм, який виникає під час вимірювання, пропорційний концентрації глюкози в зразку [8].

Через вплив різних чинників глюкозооксидазна сенсорна система має низку обмежень:

1. Відгук біосенсора багато в чому залежить від інтенсивності перемішування зразка. За недостатнього перемішування можливе спотворення відгуку, оскільки взаємодія субстрату з ензимом призводить до прогресуючого зменшення його кількості поблизу мембранної поверхні.

2. Швидкість реакції визначається особливостями ензиматичної кінетики іммобілізованого ензиму. Уявна константа Міхаеліса для іммобілізованої глюкозооксидази дорівнює 2–5 ммоль/л, насичення лінійної ділянки відгуку біосенсорів досягається на рівні 2–3 ммоль/л глюкози.

3. Властивості іммобілізованого ензиму роблять систему високочутливою до змін рН зразка, температури та концентрації кисню, що є косубстратом реакції.

4. Адсорбція протейну та клітин на мембрані може призвести до спотворення відповіді біосенсора на глюкозу.

Нині багато з перелічених проблем усувають, застосовуючи в біосенсорі спеціальні мембрани. Розширення лінійного діапазону було досягнуто зменшенням проникності глюкозних мембран. У цьому разі фактором, що лімітує швидкість процесу, є надходження глюкози через мембрану до ензиму. За підтримки мембранної системи в умовах мінімального доступу кисню співвідношення глюкоза/кисень у шарі ензиму залишається достатньо низьким, що зменшує ефекти коливання pO_2 [8].

Глюкометри

У США рівень глюкози в крові щоденно контролюють з використанням портативних глюкометрів у 40% хворих на цукровий діабет 1-го типу та 26% — 2-го типу. Ринок подібних засобів самоконтролю оцінюється в 2,7 млрд. доларів США на рік. Зараз вже можна нарахувати не менше 25 різних моделей глюкометрів.

Більшість глюкометрів базується на ензимативно-фотометричному визначенні. У таких аналізаторах використовують тест-смужки, які містять глюкозооксидазу чи гексокіназу. Краплину нерозведеної крові наносять на смужку, яка містить усі реактиви, необхідні для реакції. Тим самим запускається хід ензиматичних реакцій. Деякі смужки мають пористу мембрану, яка відокремлює еритроцити, і тоді досліджується тільки плазма крові. Сам аналізатор являє собою мініатюрний фотометр, який визначає величину відбитого світлового променя від реактивної зони смужки, що зумовлена зміною її забарвлення під час ензиматичної реакції.

Біосенсори для визначення вуглеводів

Метод іммобілізації ензимів	Ензими	Субстрат	Лінійний діапазон, мінімальна межа визначення, мМ	Стабільність біосенсора		Джерело
				Відтворюваність	Повторюваність	
Іммобілізація у вуглецевій пасті, використання НАД ⁺ , НАДФ ⁺	Фруктозо-дегідрогеназа	Фруктоза	3–25; 0,1	15%	8%	[41]
	ІНВ, МУТ, ГДГ	Сахароза	1–12; 0,1	23%	7%	
	ГДГ	Глюкоза	2–50; 0,1	25%	2%	
	ГДГ(рекомбінантна)	Галактоза	1–3; 0,2	15%	12%	
	ГДГ, МУТ, β-ГАЛ	Лактоза	6–50; 0,8	13%	11%	
Поперечне зшивання за допомогою ГА з БСА та желатином	ГОД, глюкоамілаза або α-ГЛК	Мальтоза	0,1–6,0 0,03–2,5	Через 7 днів величина відгуку зменшилась на 50%		[13]
	β-ГАЛ, ГОД	Лактоза	0,3–6,0	Через 7 днів величина відгуку зменшилась на 75%		
Поперечне зшивання за допомогою ГА	ІНВ, (МУТ), ГОД	Сахароза	0,1–6,0(з МУТ) 0,6–44(безМУТ)	Через місяць активність не зменшилась		
Іммобілізація за допомогою ГА та поліетиленіміну. Використання 5-АСК, Mg ²⁺	β-ГАЛ, ГОД, ПД	Лактоза	0,03–1	На 140-й день величина відгуку становила 40% від початкового значення		[40]
Іммобілізація з утворенням ліпідного моношару. Включення в поліонні комплекси	ГОД	Глюкоза	1–10	Через тиждень величина відгуку становила 70% від початкового значення		[18]
	β-ГАЛ, ГОД	Лактоза	0–1			
	α-ГЛК, ГОД	Мальтоза	0–5			
	ІНВ, ГОД	Сахароза	0–15			
	β-ГЛК, ГОД	Целобіоза	0–5			
Полімеризація за допомогою VA-Ероху Biosynth, поперечне зшивання за допомогою ГА з БСА та желатином	ІНВ, МУТ, ГОД	Сахароза	0–7,3	Відгуки стабільні упродовж тижня		[32]
Поперечне зшивання за допомогою ГА	α-ГЛК, МУТ, ГОД	Мальтоза	0,1–3; 5 · 10 ⁻⁵	Після 2 місяців величина відгуку сенсорів без МУТ зменшилась на 30%. У сенсорів з МУТ активність втрачалась після 3 тижнів роботи		[20]
Включення ГОД у ліпідний комплекс у нафіоновому шарі. Фотополімеризація ІНВ і МУТ за участю полівінілового спирту	ГОД	Глюкоза	2 · 10 ⁻⁴ -3	Величина відгуків незмінна протягом 4 тижнів		[48]
	ІНВ, МУТ, ГОД	Сахароза	0,01–6			
Утворення полівінілацетатних плівок, пошарова іммобілізація	Каталаза, ГОД, ІНВ	Глюкоза Сахароза	0–8	Стабільні упродовж 3 тижнів		[29]
	Аскорбатоксидаза	Аскорбат	0–2			

Метод іммобілізації ензимів	Ензими	Субстрат	Лінійний діапазон, мінімальна межа визначення, мМ	Стабільність біосенсора	Джерело
Афінна іммобілізація ІНВ за участю Co^{3+} та конкаваліну на хелатній сефарозі. Зв'язування ГОД із сефарозою через Co^{2+}	ГОД	Глюкоза	-	Іммобілізована ГОД втрачала 30% початкової активності після її інкубації при 60 °С протягом 1 год	[28]
	ІНВ, ГОД	Сахароза			
Електрополімеризація ГОД в 1,3-метафеніллендіаміні. Поперечне зшивання МУТ та ІНВ з БСА за участю ГА	ІНВ, МУТ, ГОД	Сахароза	0,05–8	Величина відгуку після 80 вимірювань становила 85% від початкового значення. Сенсор залишався стабільним понад 30 днів	[34]
Поперечне зшивання за допомогою ГА (вуглецевий електрод, модифікований берлінською лазур'ю)	ГОД, ІНВ, МУТ	Сахароза	$4 \cdot 10^{-3}$ -0,8; $15 \cdot 10^{-4}$	Після 370 хв роботи (240 вимірювань) активність зменшилась на 14%. Стабільні протягом трьох днів під час зберігання в сухих умовах, 4 °С	[49]
	ГОД	Глюкоза	$2 \cdot 10^{-3}$ -0,8; $15 \cdot 10^{-4}$		
	ГОД	Пероксид водню	10^{-3} -0,8; $5 \cdot 10^{-4}$		
Іммобілізація за допомогою гідроксилцелюлози в поліетиленгліколі; 1,1'-фероценодиметанол	ГОД	Глюкоза	0–40	Стабільні протягом 4 місяців під час зберігання в сухому стані при 4 °С	[15]
	Амілоглюкозидаза, ГОД	Мальтоза	0–20		
Іммобілізація ензимів за допомогою ГА з БСА, желатином та лізоцимом	ГОД	Глюкоза	-	З БСА сенсор працював 150 днів, з желатином — 60 днів. З лізоцимом після 230 днів роботи величина відгуку зменшилась на 50%	[26]
	ІНВ, МУТ, ГОД	Сахароза	-	З лізоцимом після 40 днів роботи величина відгуку зменшилась на 50%. З желатином сенсор працював 30 днів, а з БСА — 25	
Іммобілізація за допомогою ГА	ІНВ, МУТ, ГОД	Сахароза	$2 \cdot 10^{-4}$ -5,1	Після 40 днів зберігання в сухому стані при 4 °С сенсор втратив 30% активності	[31]
Поперечне зшивання за допомогою ГА	ГОД, ПД	Глюкоза	0–8,3	Сенсори були стабільними протягом 14 днів	[16]
	АГЛК, МУТ, ГОД, ПД	Мальтоза	-		
	ІНВ, МУТ, ГОД, ПД	Сахароза	0–0,87		
Адсорбція	Целобіозо-дегідрогеназа	Лактоза	10^{-3} -0,1; 10^{-3}	Відгук сталий протягом 290 вимірювань (11 год роботи)	[43]
Іммобілізація за допомогою ГА з БСА	АГЛК або α -ГЛК, ГОД	Мальтоза	0,2-4; 0,1	Сенсор стабільний протягом 1-го місяця	[17]

Конструкцію амперометричного датчика в глюкометрах останніх поколінь було розроблено в 1980-х рр. у Великобританії. У реакцію включався проміжний переносник електронів до електрода, при окисненні якого виникав амперометричний сигнал. Переваги подібного датчика полягають у тому, що реакція глюкозооксидази з посередником не залежить значною мірою від концентрації кисню у зразку, й посередники можуть повторно окиснюватися на електроді за менш високого потенціалу, ніж для пероксида водню. Це частково усуває електрохімічний вплив сполук, присутніх у зразках крові, зокрема сечової кислоти, вітаміну С і ацетомінофену [8].

Випуск таких датчиків було налагоджено компанією Exactech™ у Бостоні в 1987 р. Сам глюкометр складався з мініатюрних одноразових чутливих до глюкози електродів (у вигляді смужки) та власне аналізатора, що містив рідинно-кристалічний екран і мікропроцесор.

Незалежно від конструкційних особливостей аналізатора хід визначення глюкози за його допомогою є нескладною процедурою і полягає в отриманні краплини крові пацієнта шляхом уколу в палець, нанесенні її на смужку та розміщенні смужки в глюкометрі. Через 20–30 с на екрані з'являються дані концентрації глюкози. Більшість глюкометрів можуть визначати концентрацію глюкози в межах 1,7–33,3 ммоль/л (30–600 мг/100 мл).

Глюкометри виробляють багато компаній. Прикладами можуть бути Abbott/MediSense Laboratories, YSI; Bayer Corporation Esprit & Elite; The Roche Group; Home Diagnostic, Inc.; LifeScan Inc. і Arkray Kyoto (Super Glucocard II). Для визначення потрібно від 0,3 до 10 мкл крові, уся процедура триває не більше 1 хв.

На LifeScan припадає 40–45% ринку глюкометрів, потім ідуть Roche — 20–25%, Bayer — 10–15% і Abbott/MediSense — 10–15%. На решту приладів припадає не більше 20%. One Touch Profile™ LifeScan є найбільш популярним глюкометром у США. У ньому застосовано фотометричну технологію. Аналізатор Accu-Chek Complete придатний для регуляції глюкози в крові у хворих на діабет. Глюкометр LifeScan™ є електрохімічним і призначений для хворих на діабет, які ведуть активний спосіб життя. Одним зі шляхів конструктивного вдосконалення глюкометрів є зменшення розмірів приладу й розширення функцій пам'яті.

На сьогодні серед виробників глюкометрів найбільш популярним напрямом вважається амперометрія, і частка таких глюкометрів на ринку зростає порівняно з апаратами, виготовленими з використанням традиційного колориметричного підходу [8].

Біосенсиори для визначення мальтози

На сьогодні існує низка лабораторних прототипів біосенсорів для визначення мальтози [13–24] з різними іммобілізованими на поверхні електродів ензимами: амілоглюкозидазою та глюкозооксидазою [13–15]; амілоглюкозидазою, мутаротазою, глюкозооксидазою та пероксидазою [16]; α -глюкозидазою та глюкозооксидазою [13, 17–19]; α -глюкозидазою, мутаротазою та глюкозооксидазою [20]; α -глюкозидазою, глюкозодегідрогеназою [19, 21]; α -глюкозидазою та глюкочіназою [22].

Розроблені електрохімічні мальтозні біосенсиори мають різні робочі характеристики залежно від співвідношення тих чи інших ензимів, медіаторів, стабілізуювальних агентів у складі біоселективної мембрани та типу іммобілізації ензимативної мембрани на поверхні електродів. Наприклад, у роботі [15] автори повідомляють про створення амперометричної сенсорної системи на основі вуглецевих електродів для одночасного визначення в розчині мальтози та глюкози. Мальтозу визначали за допомогою двох ензимів — амілоглюкозидази та глюкозооксидази, а глюкозу — за допомогою лише глюкозооксидази. Як медіатор використовували 1,1'-фериціанідметанол. Для створення зовнішньої мембрани готували розчин з 3,5% -ю гідроксіетилцелюлозою та 3% -м поліетиленгліколем. Оптимум рН роботи сенсорної системи становив 4,8. Лінійний діапазон роботи сенсорів зберігався до 40 мМ глюкози та 20 мМ мальтози. Ензимні електроди не втрачали активності протягом чотирьох місяців зберігання в сухому стані при 4 °С.

В іншій роботі [20] автори повідомляють про створення амперометричного біосенсора для визначення мальтози, за допомогою якого визначають у зразку активність α -амілази, що гідролізує крохмаль до мальтози. Створюючи біоселективну мембрану сенсора для визначення мальтози, проводили іммобілізацію глюкозооксидази, мутаротазу та α -глюкозидази з желатином та БСА на поверхні електродів за допомогою глутарового альдегіду. Розроблений біосенсор характеризувався лінійною залежністю величини відгуку від концентрації мальтози у діапазоні 0,1–3 мМ. Час відгуку становив 30 с.

У роботі [17] автори повідомляють про розробку амперометричного ензимного сенсора для визначення вмісту мальтози в культуральній рідині. Цей біосенсор розроблявся для дослідження процесів ферментації, яка супроводжується зміною концентрації мальтози. Було розглянуто вплив α -глюкозидази та амілоглюкозидази на ефективність перетворення мальтози на глюкозу. Автори зазначають, що амілоглюкозидаза виявилася більш ефективною і тому для визначення мальтози використали суміш амілоглюкозидази та глюкозооксидази. Авторами встановлено, що за допомогою створеного сенсора вміст мальтози в різних зразках культуральної рідини можна визначати в межах 0,2–4 мМ.

У роботі [13] є повідомлення про створення амперометричного мультибіосенсора для визначення декількох вуглеводів (мальтози, лактози, сахарози та глюкози). У статті [22] йдеться про розроблення потенціометричних біосенсорів для одночасного визначення сахарози, мальтози та глюкози в розчині на основі термостабільних ензимів.

Біосенсори для визначення сахарози

На цей час вже розроблено низку лабораторних прототипів біосенсорів для визначення сахарози [22, 25–33]. Під час розроблення сахарозних біосенсорів використовують різні біологічні матеріали та методи іммобілізації ензимів. Наприклад, у роботі [34] повідомляють про застосування методу електрохімічної полімеризації фенілєндіаміну на поверхні електродів для іммобілізації інвертази, мутаротази та глюкозооксидази. У деяких роботах для перетворення α -глюкози в β -форму замість мутаротази використовували іони фосфату [35, 36]. А в роботі [26] автори застосовували коіммобілізовані з ГОД клітини дріжджів як джерело інвертази. Детектування в цьому разі також базувалось на поглинанні кисню. Є повідомлення [28] про розробку нового методу іммобілізації ензимів на поверхні електродів, за яким ензими (глюкозооксидазу, інвертазу, пероксидазу) зв'язують з хелатною сефарозою через різні іони металів та лектин конканавалін А. Цей спосіб іммобілізації дає змогу робити елюцію та повторну іммобілізацію різних ензимів на поверхні датчика. За допомогою такої оборотної іммобілізації ензимів можна визначати різні субстрати у багатокомпонентному розчині. У роботі [29] для іммобілізації ензимів автори використовували полівінілацетатний матрикс. Було показано, що створення подвійного ен-

зимного шару на поверхні електродів розширює лінійний діапазон визначення сахарози та глюкози порівняно з одношаровою мембраною. У більшості випадків для іммобілізації ензимів на поверхні електродів застосовують метод перехресного зшивання за допомогою глутарового альдегіду. Глутаровий альдегід — це сильний біфункціональний реагент, який може модифікувати ензим та зменшувати його активність. Але цей ефект може бути мінімізований завдяки використанню стабілізуючих реагентів, таких як желатин, тромбін, БСА та лізин [26]. Додаючи стабілізуючі протеїни до складу ензиматичної мембрани, можна значно поліпшити операційну стабільність сахарозного біосенсора [26].

Також існують розробки амперометричних біосенсорів для вимірювання ензиматичної активності інвертази у вільній чи іммобілізованій формі. До складу таких біосенсорів входять лише два ензими: ГОД та мутаротаза [27].

У роботах [30, 31] є повідомлення про використання амперометричних сахарозних біосенсорів в інгібіторному аналізі для визначення іонів ртуті.

Загалом, сахарозні біосенсори розробляють здебільшого для моніторингу біотехнологічного виробництва [32] та харчової промисловості [25–27]. Існують два основних варіанти (крім *off line*-аналізу) використання біосенсорів для контролю процесу виробництва: *in situ* та *on line*. При безпосередньому використанні датчиків в середині біореакторів (*in situ*) слід звернути увагу на такі моменти: 1) сенсор має залишатись у робочому стані навіть після стерилізації; 2) концентрації, які необхідно визначити в біореакторах, часто перевищують діапазон роботи сенсора; 3) велика концентрація багатьох інтерферуючих частинок, що присутні в біореакторі, може давати додатковий внесок у відгук біосенсора; 4) висока температура в біореакторі може призвести до інактивації біологічного матеріалу сенсора.

Такі високі вимоги щодо сенсорів для використання в біореакторах не дозволили поки що розробити успішні комерціалізовані варіанти. Тому майже всі застосовувані сьогодні системи працюють переважно в так званому квазібезперервному режимі аналізу. В цьому випадку аналізатор зв'язується із системою відбирання проб, коли пробу періодично відбирають із біореактора й аналізують [50].

З іншого боку, зараз також існують спеціально розроблені системи для *on line*-контролю процесу виробництва. Наприклад,

є повідомлення про створення амперометричних сахарозних біосенсорів для *on line*-контролю за хроматографічним процесом [32]. Розроблено амперометричний сахарозний біосенсор для *on line*-контролю за процесом ензиматичної біотрансформації глюкози у фруктозу за допомогою глюкозоізомерази [50].

У літературі також згадується про можливість використання мультиензимних сенсорів для одночасного визначення декількох сахаридів у зразку, наприклад сахарози, мальтози та глюкози, за допомогою потенціометричного сенсора [22].

Біосенсори для визначення лактози

На цей час у літературі є відомості щодо розроблення різних варіантів біосенсорів для визначення лактози [13, 18, 19, 21, 37–46]. Більшість із них є амперометричними з різними іммобілізованими на поверхні електродів ензимами, серед яких: β -галактозидаза та галактозооксидаза [37], β -галактозидаза і глюкозооксидаза (ГОД) [13, 18, 38–39, 47], пероксидаза хрину, глюкозооксидаза та β -галактозидаза [40], β -галактозидаза, мутаротаза та глюкозодегідрогеназа [41], β -галактозидаза, галактозодегідрогеназа [19, 21, 42], целобіозодегідрогеназа [43].

Деякі автори також повідомляють про розроблення біосенсорів для визначення лактози з використанням різних медіаторів [40, 44], що дещо ускладнює систему визначення. Наприклад, у роботі [44] як робочий електрод використовували графітовий електрод з адсорбованим на нього медіатором фероценом, а в роботі [40] як медіатор застосовували аміносаліцилову кислоту.

Є повідомлення про створення біосенсора для визначення лактози на основі мікробних клітин *Kluveromyces marxianus*, які містили ензим β -галактозидазу, та *Gluconobacter oxydans* з ензимом ГОД [45]. Ці клітини були іммобілізовані з желатином на поверхні електродів за допомогою глутарового альдегіду. Перевага такого клітинного біосенсора в тому, що клітини *Gluconobacter oxydans* були здатні окиснювати обидва аномери глюкози, що давало можливість обходитись без ензиму мутаротази. До того ж, авторами було відзначено, що додавання DEAE-декстрану та інозиту до біоселективної мембрани біосенсорів поліпшувало стабільність біосенсорів у 16 разів порівняно зі стабільністю без стабілізаторів.

У роботі [13] є повідомлення про створення амперометричного мультибіосенсора для визначення декількох сахаридів (лактози, мальтози, сахарози та глюкози). Авторами було також показано, що активність ензиму β -галактозидази в желатиновій мембрані вища, ніж в альбуміновій. У роботі [46] повідомляється про розроблення біосенсора на основі ІСПТ для визначення лактози, до складу якого входила термофільна глюкокіназа та β -галактозидаза. Ензимами не втрачали активності при температурі +50 °С. Авторами статті [49] був розроблений амперометричний мультибіосенсор для визначення глюкози, галактози та лактози й успішно апробований на практиці для визначення цих сахаридів у молоці.

Таким чином, у різних галузях харчової промисловості (цукрове, молочне виробництво, пивоваріння, виноробство) вкрай важливим є контроль вмісту вуглеводів (глюкози, сахарози, мальтози, лактози) на різних етапах виробничого процесу. Сучасні традиційні методи високоточного визначення вуглеводів потребують наявності висококваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання, яке необхідне для рідинної, газової хроматографії та деяких фізико-хімічних методів. Іншими недоліками зазначених методів є необхідність досить складної попередньої підготовки проб для аналізу. Такі методи, як поляриметрия та рефрактометрия, є простими і швидкими, але менш точними та селективними. Хімічні методи аналізу потребують значних витрат часу і є доволі трудомісткими. На противагу класичним методам аналізу вуглеводів, біосенсорні методи є більш зручними, точними, селективними, швидкими та дешевими. Створення біосенсорів для визначення вуглеводів може спростити та поліпшити існуючі системи моніторингу вмісту вуглеводів у процесі біотехнологічного виробництва (культивуація, ферментація тощо), у різних галузях харчової промисловості, в медицині та фармакології.

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

ЛІТЕРАТУРА

1. *Collins P. M., Ferrier R. J.* Monosaccharides: Their Chemistry and Their Roles in Natural Products. — Chichester: John Wiley & Sons, 1995. — 574 p.
2. *Nielsen S. S.* Food Analysis. — New York: Springer, 2003. — 557 p.
3. *Pomeranz Y., Meloan C. E.* Food Analysis: Theory and Practice. — New York: Chapman and Hall, 1994. — 778 p.
4. *Cui S. W.* Food Carbohydrates: Chemistry, Physical Properties and Applications. — Boca Raton: CRC Press, 2005. — 432 p.
5. *James C.S.* Analytical Chemistry of Foods. — Gaithersburg: Aspen Publisher, 1999. — 178 p.
6. ГОСТ 3628–78. Молочные продукты. Методы определения сахара. Введ. 01.07.1979.
7. *Синельников Б. М., Храмцов А. Г., Евдокимов И. А. и др.* Лактоза и ее производные. — СПб.: Профессия, 2007. — 768 с.
8. *Балаябина М. Д., Слепышева В. В., Козлов А. В.* Методы определения глюкозы // Terra medica nova. — 2008. — № 1–2.
9. ДСТУ ISO 5765–1:2005 (IDF 79–1:2005) і ДСТУ ISO 5765–2:2005 (IDF 79–2:2002). Молоко сухе, суміші для морозива сухі та плавлений сир. Визначення вмісту лактози. Частина 1. Ферментативний метод з використанням глюкозного компонента лактози. — Чинний від 2007–04–01. Частина 2. Ферментативний метод з використанням галактозного компонента лактози. — Чинний від 2007–07–01.
10. ГОСТ Р 51259–99 (ДИН 10344–82). Молоко и молочные продукты. Метод определения лактозы и галактозы. — Введ. 2001–01–01.
11. ГОСТ 29248–91. Консервы молочные. Йодометрический метод определения сахаров. — Введ. 01.07.93.
12. *Евтюгин Г. А., Будников Г. К., Стойкова Е. Е.* Основы биосенсорики. — Казань: Казанский государственный университет им. В. И. Ульянова-Ленина, 2007. — 80 с.
13. *Filipiak M., Fludra K., Gosciminska E.* Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of oxygen electrode // Biosens. Bioelectr. — 1996. — V. 11, N 4. — P. 355–364.
14. *Gondo S., Kim C., Hirata S., Morishita M.* Studies on dynamic behavior of the biosensor based on immobilized glucoamylase-glucose oxidase membrane // Ibid. — 1997. — V. 12, N 5. — P. 395–401.
15. *Ge F., Zhang X.E., Zhan P., Zhang X.M.* Simultaneous determination of maltose and glucose using a screen-printed electrode system // Antonie Van Leeuwenhoek. — 1997. — V. 71, N 4. — P. 345–351.
16. *Menzel C., Lerch T., Scheper T., Schugerl K.* Development of biosensors based on an electrolyte isolator semiconductor (EIS)-capacitor structure and their application for process monitoring. Part I. Development of the biosensors and their characterization // Anal. Chim. Acta. — 1995. — V. 317, N 1–3. — P. 259–264.
17. *Varadi M., Adanyi N., Nagy G., Rezessy-Szabo J.* Studying the bienzyme reaction with amperometric detection for measuring maltose // Biochimie. — 1980. — V. 62, N 8–9. — P. 587–593.
18. *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, N 1–3. — P. 387–395.
19. *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 // Anal. Chim. Acta. — 1994. — V. 296, N 3. — P. 263–269.
20. *Zajoncova L., Jilek M., Beranova V., Pec P.* A biosensor for the determination of amylase activity // Biosens. Bioelectr. — 2004. — V. 20, N 2. — P. 240–245.
21. *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 // Anal. Chim. Acta. — 1995. — V. 300, N 1–3. — P. 25–31.
22. *Aoki K., Uchida H., Katsube T. et al.* Integration of bienzymatic disaccharide sensors for simultaneous determination of disaccharides by means of light addressable potentiometric sensor // Ibid. — 2002. — V. 471, N 1. — P. 3–12.
23. *Tessema M., Ruzgas T., Gorton L., Ikeda T.* Flow injection amperometric determination of glucose and some other low molecular weight saccharides based on oligosaccharide dehydrogenase mediated by benzoquinone systems // Ibid. — 1995. — V. 310, N 1. — P. 161–171.
24. *Sun C., Zhang X., Jiang D. et al.* Electrocatalytic oxidation of carbohydrates at a molecular deposition film electrode based on water-soluble cobalt phthalocyanine and its application to flow-through detection // J. Electroanal. Chem. — 1996. — V. 411, N 1–2. — P. 73–78.
25. *Surareungchai W., Worasing S., Sritongkum P. et al.* Dual electrode signal-subtracted biosensor for simultaneous flow injection determination of sucrose and glucose // Anal. Chim. Acta. — 1999. — V. 380, N 1. — P. 7–15.
26. *Gouda M. D., Kumar M. A., Thakur M. S., Karanth N. G.* Enhancement of operational stability of an enzyme biosensor for glucose and sucrose using protein based stabilizing agents // Biosens. Bioelectr. — 2002. — V. 17, N 6–7. — P. 503–507.

27. Mutlu S., Alp B., Ozmelles R. S., Mutlu M. Amperometric Determination of Enzymatic Activity by Multienzyme Biosensors // *J. Food Engineer.* — 1997. — V. 33, N 1–2. — P. 81–86.
28. Sosnitza P., Farooqui M., Saleemuddin M. et al. Application of reversible immobilization techniques for biosensors // *Anal. Chim. Acta.* — 1998. — V. 368, N 3. — P. 197–203.
29. Popp J., Silber A., Brauchle C., Hampf N. Sandwich enzyme membranes for amperometric multi-biosensor applications: improvement of linearity and reduction of chemical cross-talk // *Biosens. Bioelectr.* — 1995. — V. 10, N 3–4. — P. 243–249.
30. Bertocchi P., Ciranni E., Compagnone D. et al. Flow injection analysis of mercury(II) in pharmaceuticals based on enzyme inhibition and biosensor detection // *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* — 1999. — V. 20, N 1. — P. 263–269.
31. Mohammadi H., Amine A., Cosnier S., Mousty C. Mercury-enzyme inhibition assays with an amperometric sucrose biosensor based on a trienzymatic-clay matrix // *Anal. Chim. Acta.* — 2005. — V. 543, N 1–2. — P. 143–149.
32. Sosnitza P., Irtel F., Ulber R. et al. Flow injection analysis system for the supervision of industrial chromatographic downstream processing in biotechnology // *Biosens. Bioelectr.* — 1998. — V. 13, N 12. — P. 1251–1255.
33. Guemas Y., Boujtita M., Murr N. E. Biosensor for Determination of Glucose and Sucrose in Fruit Juices by Flow Injection Analysis // *Appl. Biochem. Biotechnol.* — 2000. — V. 89, N 2–3. — P. 171–181.
34. Klinchan S., Choti Wongpipat W., Suwanakum T. Construction of Sensor Chip by Electrochemical polymerization Techniques for Sucrose Determination // *J. KMITENB.* — 2002. — V. 12, N 1. — P. 12–16.
35. Lima Filho J.L., Pandey P.C., Weetall H.H. An amperometric flow injection analysis enzyme sensor for sucrose using a tetracyanoquinodimethane modified graphite paste electrode // *Biosens. Bioelectr.* — 1996. — V. 11, N 8. — P. 719–723.
36. Barlikova A., Svorc J., Miertus S. Hybrid biosensor for the determination of sucrose // *Anal. Chim. Acta.* — 1991. — V. 247, N 1. — P. 83–87.
37. Sharma S.K., Singhal R., Malhotra B.D., Sehgal N. Lactose biosensor based on Langmuir-Blodgett films of poly(3-hexyl thiophene) // *Biosens. Bioelectr.* — 2004. — V. 20, N 3. — P. 651–657.
38. Svorc J., Miertus S., Barlikova A. Hybrid biosensor for the determination of lactose // *Anal. Chem.* — 1990. — V. 62, N 15. — P. 1628–1631.
39. Rajendran V., Irudayaraj J. Detection of glucose, galactose, and lactose in milk with a microdialysis-coupled flow injection amperometric sensor // *J. Dairy Sci.* — 2002. — V. 85, N 6. — P. 1357–1361.
40. Eshkenazi I., Maltz E., Zion B., Rishpon J. A three-cascaded-enzymes biosensor to determine lactose concentration in raw milk // *Ibid.* — 2000. — V. 83, N 9. — P. 1939–1945.
41. Maestre E., Katakis I., Narvaez A., Dominguez E. A multianalyte flow electrochemical cell: application to the simultaneous determination of carbohydrates based on bioelectrocatalytic detection // *Biosens. Bioelectr.* — 2005. — V. 21, N 5. — P. 774–781.
42. Kullick T., Bock U., Schubert J. et al. Electroanalytical chemistry and sensor // *Anal. Chim. Acta.* — 1995. — V. 300, N 1–3. — P. 25–31.
43. Stoica L., Ludwig R., Haltrich D., Gorton L. Third-Generation Biosensor for Lactose Based on Newly Discovered Cellobiose Dehydrogenase // *Anal. Chem.* — 2006. — V. 78, N 2. — P. 393–398.
44. 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, N 7. — P. 1285–1289.
45. Svitel J., Curilla O., Tkac J. Microbial cell-based biosensor for sensing glucose, sucrose or lactose // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 1998. — V. 27, N 2. — P. 153–158.
46. Aoki K., Suzuki H., Ishimaru Y. et al. Thermophilic glucokinase-based sensors for the determination of various saccharides and glycosides // *Sens. Actuat. B.* — 2005. — V. 108, N 1–2. — P. 727–732.
47. Jager A., Bilitewski U. Screen-printed Enzyme Electrode for the Determination of Lactose // *Analyst.* — 1994. — V. 119, N 6. — P. 1251–1255.
48. Mizutani F., Yabuki S. Rapid determination of glucose and sucrose by an amperometric glucose-sensing electrode combined with an invertase/mutarotase-attached measuring cell // *Biosens. Bioelectr.* — 1997. — V. 12, N 9. — P. 1013–1020.
49. Haghghi B., Varma S., Alizadeh Sh. F.M. et al. Prussian blue modified glassy carbon electrodes — study on operational stability and its application as a sucrose biosensor // *Talanta.* — 2004. — V. 64, N 1. — P. 3–12.
50. Дзядевич С.В. Амперометрические биосенсоры. Современные технологии создания и коммерческие варианты анализаторов // *Биополимеры и клетка.* — 2002. — Т. 18, № 5. — С. 363–376.
51. Lammers F., Scheper T. On-line monitoring of enzyme-catalyzed biotransformations with biosensors // *Enzym. Microb. Technol.* — 1997. — V. 20, N 6. — P. 432–436.

**ТРАДИЦИОННЫЕ И БИОСЕНСОРНЫЕ
МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
МОНО- И ДИСАХАРИДОВ**

В. М. Пешкова^{1,2}
*О. Я. Саяпина*¹
*О. О. Солдаткин*¹
*С. В. Дзядевич*¹

¹Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины, Киев

²Киевский национальный университет имени
Тараса Шевченко

E-mail: victoriya.p@gmail.com

В обзоре описаны наиболее важные моно- и дисахариды, их физико-химические характеристики и применение в пищевой промышленности. Приведен анализ классических методов качественного и количественного определения моно- и дисахаридов с указанием недостатков и преимуществ каждого из методов. Рассмотрены преимущества существующих биосенсоров для определения углеводов в сравнении с традиционными методами анализа.

Ключевые слова: углеводы, традиционные методы определения, биосенсоры.

**TRADITIONAL AND BIOSENSOR
METHODS OF MONO- AND
DISACCHARIDES DETERMINATION**

V. M. Pyeshkova^{1,2}
*O. Y. Saiapina*¹
*O. O. Soldatkin*¹
*S. V. Dzyadevych*¹

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

²Taras Shevchenko National University of Kyiv

E-mail: victoriya.p@gmail.com

The most important mono- and disaccharides, its physical-chemical characteristics and application in food industry have been described in the article. Methods for their quantitative and qualitative analysis with advantages and disadvantages have been characterized. The advantages of carbohydrates biosensors have been described compared to traditional methods of analysis.

Key words: carbohydrates, traditional methods of determination, biosensors.