

## ЕНЗИМНИЙ КОНДУКТОМЕТРИЧНИЙ БІОСЕНСОР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ФРУКТОЗИ

О. Є. Дудченко<sup>1,2</sup>

В. М. Пешкова<sup>1</sup>

О. О. Солдаткін<sup>1</sup>

О. П. Солдаткін<sup>1,2</sup>

С. В. Дзядевич<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

<sup>2</sup>Інститут високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Україна

E-mail: dc182@yandex.ru

Отримано 05.07.2012

Розроблено кондуктометричний біосенсор для визначення фруктози, який функціонує на основі ензиму фруктозодегідрогенази та медіатора електронів фериціаніду калію. Ензим було коімобілізовано разом із сироватковим альбуміном бика на поверхні кондуктометричного перетворювача методом попережного зшивання глутаровим альдегідом. Підібрано оптимальні умови функціонування біосенсора. Досліджено залежність його роботи від концентрації робочого буферного розчину та концентрації в ньому медіатора електронів фериціаніду калію. Біосенсор виявляв високу відтворюваність сигналу та селективність стосовно фруктози. Показано, що розроблений кондуктометричний біосенсор можна використовувати для моніторингу вмісту фруктози в харчових продуктах та в медичній діагностиці.

**Ключові слова:** кондуктометричний біосенсор, фруктоза, фруктозодегідрогеназа, фериціанід калію.

Фруктоза — поширений у природі моносахарид, найбільше її міститься у фруктах, зокрема у винограді, яблуках, грушах, бананах [1]. Вона входить також до складу бджолиного меду й олігосахаридів: рафінози, сахарози, стахіози, полісахаридів інуліну та левану. Завдяки високій гігроскопічності фруктозу дедалі частіше застосовують у виробництві мармеладу, цукерок, пряників, печива та інших солодощів, оскільки вона дає змогу затримати процес черствіння продуктів. На сьогодні фруктоза є одним з найперспективніших замінників цукру під час профілактики та лікування цукрового діабету, адже вона добре засвоюється організмом людини і, на відміну від глюкози, не потребує присутності інсуліну [2]. Окрім того, фруктоза не сприяє розвитку зубного карієсу на відміну від глюкози або сахарози [1].

Надлишок фруктози в крові та сечі людини свідчить про порушення її метаболізму, зокрема про есенціальну фруктозурію, фруктоземію та спадкову недостатність фруктозо-1,6-дифосфатази, тому для виявлення цих порушень слід проводити лабораторний аналіз фруктози в крові та сечі. Для діагностики фруктозурії роблять лабораторний аналіз сечі з метою виявлення фруктози, яка у хворих людей накопичується у великій кількості. Дієта пацієнтів з вище-

зазначеними захворюваннями передбачає вилучення з їхнього раціону будь-яких фруктозовмісних продуктів та напоїв [3], тому виробництво дієтичних продуктів харчування для людей з непереносимістю фруктози передбачає обов'язковий контроль рівня фруктози в готовій продукції.

У деяких випадках рівень фруктози в продуктах харчування є показником їхньої якості. Наприклад, кількість фруктози у бджолиному меду, а також співвідношення її з кількістю інших цукрів свідчить про зрілість меду, метод та кліматичні умови його виготовлення і зберігання, ймовірність фальсифікації меду тощо [4].

У медицині визначення фруктози є дуже важливим. Так, аналіз фруктози здійснюють під час проведення спермограми. Її рівень у спермі є вагомим для діагностики обструктивної азооспермії, запалень сім'яних пухирців, передміхурової залози та бульбоуретральних залоз у чоловіків. Також аналіз на рівень фруктози у спермі може сприяти коректній діагностиці ретроградної еякуляції [5, 6].

З огляду на це необхідними є зручні, точні, селективні, швидкі та дешеві методи моніторингу фруктози в харчовій, біотехнологічній промисловості та в медицині. Існуючі на сьогодні стандартні методи висо-

коточного визначення фруктози, такі як рідинна та вискоэффективна рідинна хроматографія, потребують наявності кваліфікованого персоналу, складного і високовартісного обладнання [7] та досить непростой попередньої підготовки проб для аналізу. Інші методи, зокрема поляриметрія, рефрактометрія та хімічні, є простішими і швидшими у виконанні, але менш точними й селективними. Створення біосенсора для визначення фруктози може поліпшити систему моніторингу вмісту фруктози в харчових продуктах та в медичній діагностиці.

У літературі описано різні варіанти біосенсорів для визначення фруктози, більшість з яких є ензимними електрохімічними біосенсорами [8–16]. Існують також мікробні біосенсори для визначення фруктози. Є повідомлення про розроблення амперометричної біосенсорної системи для визначення фруктози, сахарози та глюкози з іммобілізованими на поверхні золотих електродів клітинами трьох різних мутантних штамів *Escherichia coli* K12, кожен з яких був специфічним до одного з трьох сахаридів [17].

У роботі більшості існуючих нині біосенсорів для визначення фруктози використовують ензим фруктозодегідрогеназу (ФДГ) та різні медіатори електронів. У роботах [8, 13] описано кілька варіантів ензимного амперометричного біосенсора, створених шляхом нанесення ФДГ, медіатора фероцену та нафіону у складі целюлозоацетатної мембрани на поверхню скловуглецевого електрода з метою запобігання вимиванню медіатора з мембрани. Автори [9] повідомляють про амперометричний біосенсор для визначення фруктози в зразках харчових продуктів на основі ензиму ФДГ, включеного в карбонову пастову матрицю разом з медіатором  $\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}$ . Є дані про метод виготовлення амперометричного безмедіаторного біосенсора для визначення фруктози [10], в якому ФДГ іммобілізується включенням в карбонову пасту, але з додатковим покриттям шару ензиму діалізною мембраною. Автори також відзначають вплив аскорбінової кислоти на вимірювання фруктози. З'ясовано, що за значних концентрацій аскорбінової кислоти в зразках ( $> 0,08$  мМ) такий вплив можна нівелювати, додатково модифікуючи електрод аскорбатоксидазою. У роботі [11] описано ензимний амперометричний біосенсор для визначення фруктози в системі проточно-ін'єкційного аналізу. Ензим ФДГ наносили на карбоновий пастовий електрод у складі попередньо одержаної

суміші ФДГ і графітової пудри. Описано також фруктозні амперометричні біосенсори [12], які одержували, абсорбуючи ФДГ у графітовій матриці з медіаторами фериціанідом або тетраціанохінодиметаном, з подальшим утворенням тонкого непровідного електрополімерного шару 1,3-фенілендіамін-резорцинолу. Проведено порівняння двох різних процедур іммобілізації ФДГ з метою створення амперометричного біосенсора для визначення фруктози [14]. У першому методі ФДГ іммобілізували в шарі поліпіролу на платиновому електроді з фериціанідом калію як медіатором за допомогою електрополімеризації. За іншим методом ФДГ іммобілізували на платиновому електроді ковалентним зв'язуванням з ГА на шарі поліпіролу з фериціанідом. Описано біосенсор для одночасного визначення глюкози і фруктози, який було створено іммобілізацією суміші ГОД, ФДГ та медіатора тетратіафулвалену методом поперечного зшивання з ГА на попередньо модифікованому меркаптопропіоновою кислотою золотому електроді [15]. Є повідомлення про розроблення кількох варіантів біосенсора для визначення фруктози з метою функціонування у складі триканального амперометричного мультибіосенсора для визначення глюкози, фруктози й етанолу [16]. Фруктозу виявляють за допомогою ФДГ та одного з трьох медіаторів: фероцену, 2-гексадеканоу та фериціаніду, які іммобілізували в складі графітової суспензії. У кожному з трьох варіантів біосенсорів під час вимірювання в реакційне середовище додавали 2 мМ фериціаніду калію. Біосенсор з фероценом мав найширший лінійний діапазон визначення, а біосенсор з 2-гексадеканоном характеризувався вищою операційною стабільністю.

Попри велику кількість повідомлень про розроблення амперометричних біосенсорів для визначення фруктози, досі ще не було налагоджено промислового випуску жодної такої системи. Можливо, на заваді цьому стоїть низка недоліків амперометричних біосенсорів, зокрема використання технологічно складного й дорогого електрода порівняння та інтерферуючий вплив електроактивних речовин унаслідок окиснення їх на електроді, чого не відбувається під час роботи з кондуктометричними біосенсорами. До того ж кондуктометричні біосенсори завдяки недорогій сучасній тонкоплівчастій технології виготовлення можуть суттєво мініатюризуватися, що зробить їх використання ще зручнішим [18].

### Матеріали і методи

**Матеріали.** У дослідженнях використовували ліофілізований ензим фруктозодегідрогенази (ЕС 1.1.99.11) з *Gluconobacter* sp. активністю 148 од. акт./мг фірми Sigma-Aldrich Chemie. Сироватковий альбумін бика (БСА) (V фракція), 50%-й водний розчин глутарового альдегіду (ГА) — фірми Sigma-Aldrich Chemie, фруктозу одержали від фірми Fluka. Інші неорганічні сполуки, застосовувані в роботі, були вітчизняного виробництва зі ступенем чистоти «х. ч.» і «ч. д. а.».

Для дослідження застосовували кондуктометричні перетворювачі, виготовлені згідно з нашими рекомендаціями в Інституті фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України (Київ). Вони мають розмір 5×30 мм і складаються з двох ідентичних пар золотих гребінчастих електродів, виготовлених вакуумним напиленням золота на основу із ситалу (рис. 1). Чутлива поверхня кожної пари електродів становила близько 1,5 мм<sup>2</sup>. Відстань між пальцями гребінок та ширина самих пальців — 20 мкм.



Рис. 1. Зовнішній вигляд кондуктометричного планарного гребінчастого перетворювача

**Приготування біоселективних мембран.** З метою іммобілізації ФДГ на поверхні перетворювача використовували метод поперечного зшивання глутаровим альдегідом. Розчин для створення активної мембрани містив 10% фруктозодегідрогенази, 5% БСА та 20% гліцеролу в 20мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,0. Розчин для референтної мембрани складався з тих самих компонентів, за винятком ензиму ФДГ, який було замінено на аналогічну кількість БСА, кінцева концентрація якого становила 15%. Таким чином, вміст протеїну в розчинах для приготування активної та референтної мембран був однаковим. Перед нанесенням на відповідні пари електродів кожен із цих розчинів окремо змішували з 1%-м водним розчином глутарового альдегіду у співвідношенні 1:1. Нанесення розчинів для активної мембрани та мембрани порівняння на відповідні пари електродів проводили мікропіпеткою Eppendorf. Для завершення іммобілізації перетворювачі

з нанесеними на їхню поверхню розчинами витримували при температурі 24 °С протягом 20 хв. На наступному етапі електроди з іммобілізованими біоселективними мембранами витримували за помірного перемішування у 7,5 мМ цитратфосфатному буферному розчині, рН 5,0, протягом 10 хв, щоб видалити надлишок ГА.

**Установка для досліджень.** Для вимірювання залежності зміни провідності в приелектродному шарі кондуктометричного перетворювача від концентрації фруктози в розчині було використано вимірювальну установку (рис. 2).

З низькочастотного генератора сигналів ГЗ-118 (Україна) змінна напруга з частотою 100 кГц та амплітудою 10 мВ подається на диференційну пару гребінчастих електродів, які з біоселективними мембранами занурюються в робочу комірку з буферним розчином. Отриманий на електродах біосенсора сигнал знімається з опорів навантаження  $R_n = 1$  кОм і через диференційний підсилювач Unipan-233-6 (Польща) надходить на селективний фазочутливий нановольтметр Unipan-232-В (Польща). Після нановольтметра цей сигнал надходить на реєструвальний пристрій.

**Методика вимірювань.** Вимірювання здійснювали у цитратфосфатному буферному розчині різних молярностей, за різних значень рН, при кімнатній температурі (24–25 °С) у відкритій комірці з інтенсивним

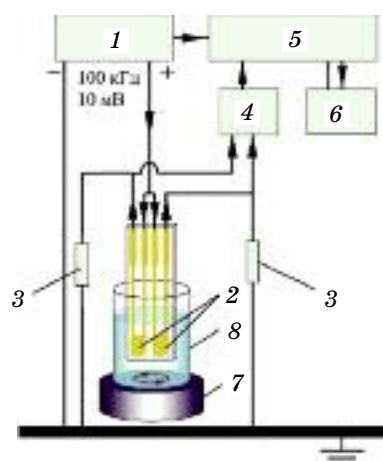


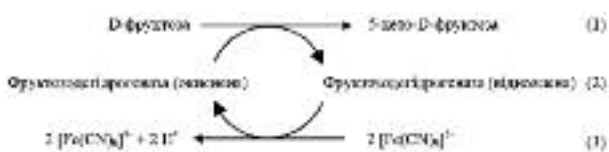
Рис. 2. Схема установки для проведення кондуктометричних вимірювань:

1 — генератор сигналів; 2 — дві пари електродів з активною та референтною мембранами; 3 — опори навантаження; 4 — диференційний підсилювач; 5 — нановольтметр; 6 — реєструвальний пристрій; 7 — магнітний перемішувач; 8 — робоча комірка з буферним розчином (2 мл)

перемішуванням. Щоб одержати стабільний початковий сигнал (базову лінію), кондуктометричний біосенсор деякий час витримували в суміші буферного розчину та фериціаніду калію, який у певній концентрації додавали в робочу комірку щоразу перед внесенням досліджуваного зразка. Далі одержували відгук на внесення в комірку певної аліквоти стандартного концентрованого розчину фруктози. Застосований у роботі диференційний режим вимірювань підвищував чутливість біосенсора завдяки мінімізації шумів та сторонніх неспецифічних сигналів, які виникають через коливання температури, рН середовища, напруги в мережі.

### Результати та обговорення

В основі роботи кондуктометричного біосенсора для визначення фруктози лежить ензиматична реакція, що відбувається за участю медіатора електронів фериціаніду калію:



Фруктозодегідрогеназа каталізує окиснення фруктози до 5-кето-D-фруктози (1), переходячи при цьому у відновлений стан (2). Зворотне окиснення відновленої фруктозодегідрогенази здійснюється за допомогою електронного медіатора фериціаніду калію  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , який слугує акцептором електронів. У результаті такого ензиматичного медіаторного процесу утворюється відновлений фероціанід  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$  та протони (3),

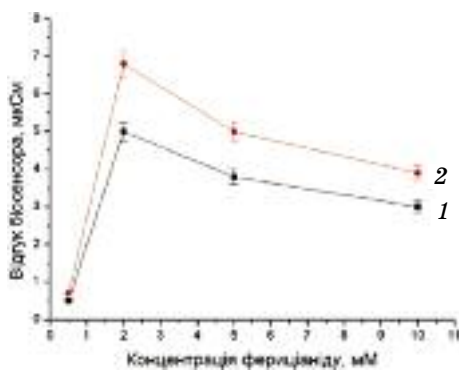


Рис. 3. Графіки залежності відгуків фруктозного біосенсора на внесення 0,25 мМ фруктози (1) та 0,5 мМ фруктози (2) від концентрації фериціаніду калію у вимірювальній комірці: вимірювання проводили у 7,5 мМ цитратфосфатному буферному розчині, рН 5,0

унаслідок чого відбувається зміна провідності розчину, що є пропорційною концентрації фруктози, яку реєструють за допомогою кондуктометричного біосенсора [19].

Робота кондуктометричного біосенсора для визначення фруктози істотно залежить від концентрації фериціаніду калію, адже у цій системі він виконує роль медіатора електронів. Аби перевірити, як концентрація фериціаніду калію впливає на чутливість фруктозного біосенсора, проводили серію вимірювань, за яких до вимірювальної комірки з робочим буферним розчином вносили різні концентрації фериціаніду калію (0,5; 2; 5; 10 мМ), після чого одержували відгуки біосенсора на додавання фруктози.

Для підтвердження одержаних результатів експеримент повторювали для двох концентрацій фруктози (0,25 та 0,5 мМ), що знаходяться в лінійному діапазоні роботи біосенсора. За концентрації фериціаніду 0,5 мМ спостерігали дуже низькі відгуки на внесення фруктози, що може пояснюватися недостатнім надходженням фериціаніду в біоселективну мембрану, внаслідок чого ензиматичні та дифузійні процеси у мембрані відбуваються повільніше, ніж у разі використання 2 мМ фериціаніду, за якого відгуки на фруктозу були максимальними. Поступове збільшення концентрації фериціаніду калію до 10 мМ призводить до зниження сигналу біосенсора, оскільки це зумовлює підвищення фонові провідності розчину, внаслідок чого чутливість кондуктометричних біосенсорів зменшується.

В основі кондуктометричного методу, як відомо, лежить вимірювання зміни провідності аналізованого розчину. Зміна провідності може залежати як від самої ензиматичної реакції, так і від характеристик розчину, в якому ця реакція відбувається. Тому в наступному експерименті досліджували вплив концентрації робочого буферного розчину на величину відгуку біосенсора на основі ФДГ. На рис. 4 показано залежність величин відгуків біосенсора від концентрації фруктози у буферних розчинах з різними буферними ємностями розчину (калібрувальні графіки). Аналізуючи отримані калібрувальні криві, встановили, що зі зміною концентрації буферного розчину певною мірою змінюються величини відгуків біосенсора та лінійний діапазон визначення фруктози. Чутливість кондуктометричного біосенсора щодо наявності фруктози виявилася найбільшою у 7,5 мМ цитратфосфатному буферному розчині, рН 5,0. Але в цьому разі біосенсор показував лінійну залежність

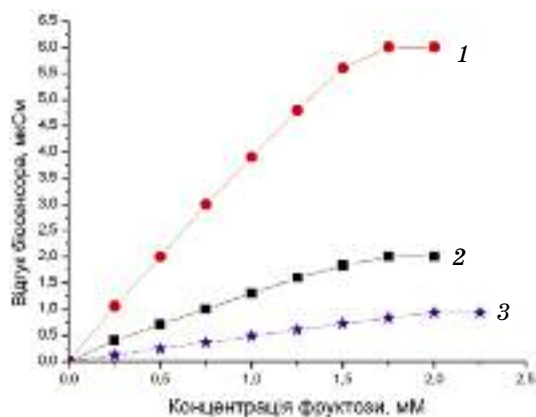


Рис. 4. Графіки залежності величин відгуків фруктозного біосенсора від концентрації фруктози, одержані у 7,5 мМ (1), 15 мМ (2) та 60 мМ (3) цитратфосфатному буферному розчині, рН 5,0; концентрація фериціаніду калію у вимірювальній комірці — 2 мМ

величини відгуку від концентрації фруктози до 1,5 мМ. Під час роботи біосенсора в 15 мМ цитратфосфатному буферному розчині лінійний діапазон визначення фруктози був дещо ширшим. У 60 мМ буфері чутливість біосенсора щодо субстрату суттєво знижувалась, але при цьому лінійний діапазон збільшився до 2 мМ. Тому, використовуючи для проведення аналізу буферні розчини різної концентрації, можна отримувати різні діапазони роботи біосенсора з різною чутливістю, що дає змогу адаптувати його роботу до конкретних прикладних завдань.

Однією з найважливіших характеристик будь-якого біосенсора є відтворюваність його сигналів упродовж роботи. Тому було проведено низку дослідів з перевірки відтворюваності сигналів фруктозного кондуктометричного біосенсора (рис. 5). Для цього багаторазово одержували відгук біосенсора, додаючи 0,5 мМ стандартного розчину фруктози до вимірювальної комірки з робочим буферним розчином у присутності 2 мМ фериціаніду калію. Таку процедуру повторювали протягом робочого дня через кожні 15 хв, здійснюючи дворазове промивання біосенсорів робочим буферним розчином між усіма вимірюваннями. Як впливає з графіка, біосенсор для визначення фруктози характеризувався високою відтворюваністю сигналу, відносно стандартне відхилення результатів становило 3,0%.

Проведення кількісного аналізу реальних зразків на вміст фруктози за допомогою розробленого біосенсора є можливим за відсутності значного впливу з боку інтерферую-

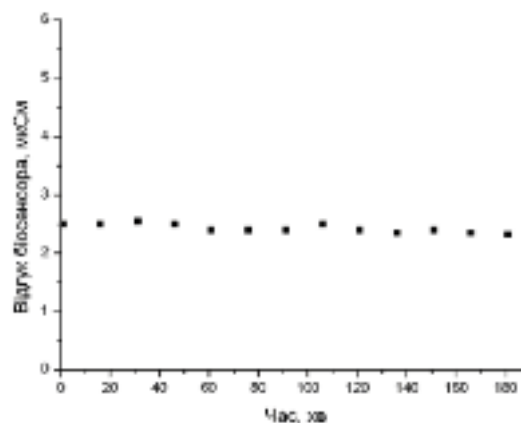


Рис. 5. Відтворюваність сигналів фруктозного кондуктометричного біосенсора з додаванням 0,5 мМ фруктози: вимірювання проводили у 7,5 мМ цитратфосфатному буферному розчині, рН 5,0, у присутності 2 мМ фериціаніду калію

чих речовин (інших сахаридів), що можуть міститись у досліджуваних зразках, оскільки це негативним чином позначиться на точності аналізу. Для випробовування селективності фруктозного біосенсора в робочу комірку із 7,5 мМ цитратфосфатним буферним розчином, рН 5,0, та 2 мМ фериціанідом калію вносили різні потенційні інтерферуючі компоненти в кількості 0,5 мМ. Одержані результати з перевірки селективності наведено в таблиці. Відгуки біосенсора розраховували у відсотках (за 100% було взято відгук біосенсора на 0,5 мМ фруктози).

Згідно з отриманими даними біосенсор для визначення фруктози не дає відгуку на жодну з досліджуваних речовин. Це свідчить про високу специфічність розробленого біосенсора до фруктози, а отже й можливість його застосування без попередньої обробки реального зразка.

З урахуванням результатів, отриманих в експериментах з підбору оптимальних умов

#### Селективність біосенсора для визначення фруктози

0,5 мМ субстанції	Відносний відгук біосенсора, %
Фруктоза	100
Арабіноза	0
Галактоза	0
Маноза	0
Глюкоза	0
Сахароза	0
Мальтоза	0
Лактоза	0
Сорбіт	0

роботи біосенсора, одержали калібрувальний графік залежності величини відгуків біосенсора від концентрації фруктози (рис. 6).

Мінімальна концентрація фруктози, яку можна було визначити біосенсором, стано-

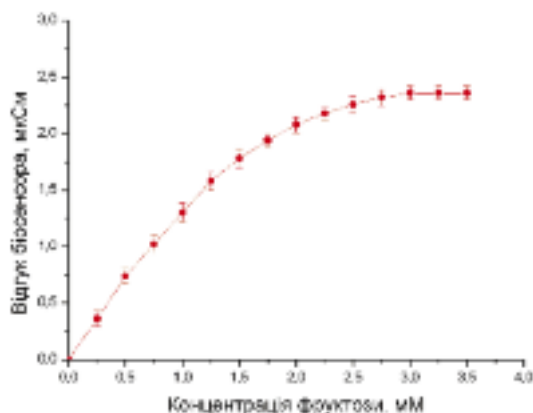


Рис. 6. Калібрувальна крива біосенсора для визначення концентрації фруктози: вимірювання проводили у 7,5 мМ цитратфосфатному буферному розчині, рН 5,0, у присутності 2 мМ фериціаніду калію

вила 0,05 мМ фруктози (відношення сигналу до шуму не менше 3). Лінійну залежність між концентрацією фруктози, яку додавали

в робочу комірку, та відгуком розробленого кондуктометричного біосенсора спостерігали до 1,75 мМ фруктози.

Отже, створено кондуктометричний біосенсор для визначення фруктози на основі ензиму фруктозодегідрогенази та досліджено його головні аналітичні характеристики. Підібрано оптимальну концентрацію фериціаніду калію для функціонування біосенсора — 2 мМ. Встановлено, що зі збільшенням концентрації цитратфосфатного буферного розчину чутливість біосенсора знижується, водночас розширюється лінійний діапазон визначення фруктози. Лінійний діапазон роботи біосенсора становить від 0,05 мМ до 1,75 мМ фруктози. Розроблений біосенсор характеризується високою відтворюваністю сигналів та селективністю до фруктози. Таким чином, цей кондуктометричний біосенсор можна застосовувати для моніторингу вмісту фруктози в харчових продуктах та в медичній діагностиці.

Роботу виконано за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація».

## ЛІТЕРАТУРА

1. Дорохович В. Фруктоза имеет наибольшую сладость среди заменителей сахара // Хлібопек. кондитер. пром. України. — 2011. — № 1. — С. 38–39.
2. Barclay T., Ginic-Markovic M., Cooper P. D., Petrovsky N. The chemistry and sources of fructose and their effect on its utility and health implications // J. Excip. Food Chem. — 2012. — N 3. — P. 67–81.
3. Строчкова Т. В., Журкова Н. В., Павловская Е. В., Каганов Б. С. Наследственные метаболические болезни печени: 1. Нарушения метаболизма углеводов; 2. Лизосомные болезни накопления // Вопр. практ. педиатр. — 2009. — Т. 4, № 5. — С. 28–37.
4. Guler A., Bakan A., Nisbet C., Yavuz O. Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup // Food Chem. — 2007. — V. 105, N 3. — P. 1119–1125.
5. Lu J., Chen F., Xu H. et al. Standardization and quality control for determination of fructose in seminal plasma // J. Androl. — 2007. — V. 28, N 2. — P. 207–213.
6. Anderson R., Reddy J. M. Jr., Oswald C., Zaneveld L. J. D. Enzymic determination of fructose in seminal plasma by initial rate analysis // Clin. Chem. — 1979. — V. 25, N 10. — P. 1780–1782.
7. Birch G.G. Methods of carbohydrate analysis // Asean J. Sci. Technol. development. — 1985. — N 1. — P. 88–97.
8. Tkac J., Vostiar I., Gemeiner P., Strudik E. Stabilization of ferrocene leakage by physical retention in a cellulose acetate membrane. The fructose biosensor // Bioelectrochemistry. — 2002. — V. 55. — P. 149–151.
9. Parades P. A., Parellada J., Fernandez V. M. et al. Amperometric mediated carbon paste biosensor based on D-fructose dehydrogenase for the determination of fructose in food analysis // Biosens. Bioelectron. — 1997. — V. 12, N 12. — P. 1233–1243.
10. Ikeada T., Matsushita F., Senda M. Amperometric fructose sensor based on direct bioelectrocatalysis // Ibid. — 1991. — V. 6. — P. 299–304.
11. Parellada J., Dominguez E., Fernandez V. M. Amperometric flow injection determination of fructose in honey with a carbon paste sensor based on fructose dehydrogenase // Anal. Chim. Acta. — 1996. — V. 330. — P. 71–77.
12. Bassi A. S., Lee E., Zhu J.-X. Carbon paste mediated, amperometric, thin film biosensors for fructose monitoring in honey // Food

- Res. Intern. — 1998. — V. 31, N 2. — P. 19–127.
13. Tkac J., Vostiar I., Gemeiner P. et al. Fructose biosensor based on D-fructose dehydrogenase immobilized on a ferrocene-embedded cellulose acetate membrane // Anal. Chim. Acta. — 2001. — V. 439, N 1. — P. 39–46.
  14. Garcia C. A. B., Neto G., Kubota L. T. New fructose biosensors utilizing a polypyrrole film and D-fructose 5-dehydrogenase immobilized by different processes // Ibid. — 1998. — V. 374. — P. 201–208.
  15. Campuzano S., Loaiza O., Pedrero M. et al. An integrated bienzyme glucose oxidase–fructose dehydrogenase–tetrathiafulvalene–3–mercaptopropionic acid–gold electrode for the simultaneous determination of glucose and fructose // Bioelectrochemistry. — 2004. — V. 63. — P. 199–206.
  16. Miertus S., Katrlík J., Pizzariello A. et al. Amperometric biosensors based on solid binding matrices applied in food quality monitoring // Biosens. Bioelectron. — 1998. — V. 13. — P. 911–923.
  17. Held M., Schuhmann W., Jahreis K., Schmidt H. L. Microbial biosensor array with transport mutants of *Escherichia coli* K12 for the simultaneous determination of mono- and disaccharides // Ibid. — 2002. — V. 17. — P. 1089–1094.
  18. Kissinger P. T. Biosensors — a perspective // Ibid. — 2005. — V. 20. — P. 2512–2516.
  19. Trivedi U. B., Lakshminarayana D., Kothari I. L. et al. Amperometric fructose biosensor based on fructose dehydrogenase enzyme // Sens. Act. B. — 2009. — V. 136. — P. 45–51.

### ЭНЗИМНЫЙ КОНДУКТОМЕТРИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФРУКТОЗЫ

А. Е. Дудченко<sup>1,2</sup>, В. Н. Пешкова<sup>1</sup>,  
А. А. Солдаткин<sup>1</sup>, А. П. Солдаткин<sup>1,2</sup>,  
С. В. Дзядевич<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии и генетики  
НАН Украины, Киев

<sup>2</sup>Институт высоких технологий  
Киевского национального университета  
имени Тараса Шевченко, Украина

E-mail: dc182@yandex.ru

Разработан кондуктометрический биосенсор для определения фруктозы, функционирующий на основе ферментов фруктозодегидрогеназы и медиатора электронов феррицианида калия. Фермент был коиммобилизован вместе с бычьим сывороточным альбумином на поверхности кондуктометрического преобразователя методом поперечной сшивки с глутаровым альдегидом. Подобраны оптимальные условия работы биосенсора. Исследована зависимость его функционирования от концентрации рабочего буферного раствора и концентрации в нем медиатора электронов феррицианида калия. Биосенсор обладал высокой воспроизводимостью сигналов и селективностью относительно фруктозы. Показано, что разработанный кондуктометрический биосенсор можно применять для мониторинга содержания фруктозы в пищевых продуктах, а также в медицинской диагностике.

**Ключевые слова:** кондуктометрический биосенсор, фруктоза, фруктозодегидрогеназа, феррицианид калия.

### ENZYME CONDUCTOMETRIC BIOSENSOR FOR FRUCTOSE DETERMINATION

O. Y. Dudchenko<sup>1,2</sup>, V. N. Pyeshkova<sup>1</sup>,  
O. O. Soldatkin<sup>1</sup>, O. P. Soldatkin<sup>1,2</sup>,  
S. V. Dzyadevych<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics  
of National Academy of Sciences of Ukraine,  
Kyiv

<sup>2</sup>Institute of High Technologies of Kyiv  
National Taras Shevchenko University, Ukraine

E-mail: dc182@yandex.ru

The conductometric biosensor for fructose determination based on fructose dehydrogenase and potassium ferricyanide mediator as electron acceptor has been developed. The enzyme was immobilized on a surface of the conductometric transducer together with bovine serum albumin using crosslinking with glutaraldehyde. Working conditions of the described fructose biosensor were optimized. The results concerning influence of the buffer solution concentration and potassium ferricyanide concentration on the biosensor performance are given. The fructose biosensor is characterized by high signal reproducibility and selectivity to fructose. The developed conductometric biosensor can be successfully used for fructose monitoring in the procedures of food and clinical diagnostic.

**Key words:** conductometric biosensor, fructose, fructose dehydrogenase, potassium ferricyanide.