

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

УДК 543.553, 543.6, 543.94, 663.21

ФЕРМЕНТНІ БІОСЕНСОРИ ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО АНАЛІЗУ КОМПОНЕНТІВ ВИНА

Т. Б. Горюшкіна^{1,2}, С. В. Дзядевич¹

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03143 тел: (044) 200-03-28;

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка,
вул. Володимирська, 64, Київ, Україна, 01003 тел: (044) 252-39-92
e-mail: dzyad@yahoo.com, tatiana_goryushkina@yahoo.com

Анотація

ФЕРМЕНТНІ БІОСЕНСОРИ ДЛЯ КІЛЬКІСНОГО АНАЛІЗУ КОМПОНЕНТІВ ВИНА

Т. Б. Горюшкіна, С.В. Дзядевич

В огляді наведено характеристику ферментних біосенсорів для кількісного визначення компонентів вина, які були створені протягом останніх років, та проаналізовано їхні основні переваги та недоліки.

Ключові слова: вино, ферментні амперометричні біосенсори, кількісний аналіз

Abstract

ENZYMATIC BIOSENSORS FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF WINE'S COMPONENTS

T. B. Goriushkina, S. V. Dzyadevych

Characteristics of enzymatic amperometric biosensors for quantitative analysis of wine's components created during last years were presented and their main advantages and disadvantages were described.

Keywords: wine, enzymatic amperometric biosensors, quantitative analysis

Аннотация**ФЕРМЕНТНЫЕ БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА КОМПОНЕНТОВ ВИНА***Т. Б. Горюшкина, С. В. Дзядевич*

В обзоре приведена характеристика ферментных биосенсоров для количественного анализа компонентов вина, которые были созданы на протяжении последних лет, и проанализированы их основные преимущества и недостатки.

Ключевые слова: вино, ферментные амперометрические биосенсоры, количественный анализ

1. Вступ

Вина є багатокомпонентними системами, до їх складу входять органічні кислоти, вуглеводи, спирти та багато інших сполук. Вміст інгредієнтів вина широко варіюється в залежності від різновиду і сорту винограду, кліматичних, геологічних, агротехнічних та інших умов. За їх якісним та кількісним вмістом у винах можна судити про натуральність напоїв і правильність технології їх виробництва [1]. Тому винна продукція на всіх стадіях виробництва повинна проходити техніко-хімічний контроль, мета якого полягає у кількісному аналізі компонентів, що входять до складу суслу та вина, і визначенні їх впливу на якість кінцевого продукту [2, 3].

Ферментний аналіз як частина біоаналітичної хімії на даний час займає одне з центральних місць в області контролю якості продуктів харчування, у тому числі і алкогольних напоїв. Методи ферментного аналізу дозволяють достовірно, швидко та без істотних витрат проводити визначення багатьох компонентів харчових продуктів, які характеризуються високою специфічністю і аналіз яких традиційними методами іноді можливий з обмеженою вірогідністю результатів [4].

Одним з нових напрямків сучасного ферментного аналізу є дослідження в області розробки біосенсорів — приладів нового покоління, які поєднують у собі біоселективний елемент з фізичним перетворювачем та володіють широкими перевагами у порівнянні з класичними методами аналізу при використанні їх у харчовій промисловості [2, 5].

Будь-який ферментний біосенсор є поєднанням двох принципових функціональних складових: біоселективної мембрани, що містить у собі іммобілізований фермент, та фізичного перетворювача, який відповідає за трансформацію біохімічного сигналу в електричний. При цьому селективність ферментного біосен-

сора при кількісному аналізі субстратів залежить у першу чергу від біологічного елемента — ферменту, а чутливість датчика визначається переважно фізичним перетворювачем [6].

Робота переважної більшості ферментних біосенсорів, створених протягом останніх років для аналізу компонентів вина, базується на амперометричному методі детекції. Це обумовлено перш за все тим, що відгук амперометричних біосенсорів не залежить від буферної ємності та іонної сили розчину, в якому проводиться вимірювання [7], а це, безперечно, є великою перевагою при проведенні аналізів реальних рідин.

Найпростіший випадок при конструюванні ферментного амперометричного біосенсора реалізується за умови, що або субстрат, або продукт ферментативної реакції є електрохімічно активним — здатним швидко і бажано оборотно окиснюватися чи відновлюватися на електроді при накладанні на нього відповідного потенціалу. Якщо субстрат чи продукт реакції відповідає даній вимозі, його концентрацію можна виміряти, використовуючи амперометричний перетворювач [8, 9].

На даний час розроблено ряд ферментних біосенсорів, призначених для кількісного визначення найголовніших компонентів вин, а саме:

спиртів — етанолу [10 — 21], метанолу [16, 20] та гліцерину [11, 22 — 26];

альдегідів — ацетальдегіду [27, 28];

вуглеводів — глюкози [11, 14, 15, 29 — 35] та фруктози [14, 36 — 38];

органічних кислот — лактату [7, 14, 28, 39 — 45], малату [14, 39, 42, 44, 46] та ацетату [47];

фенольних сполук [48 — 51];

вітамінів — аскорбінової кислоти [51];

мінеральних речовин — сульфідів [14, 51 — 53].

Розроблені датчики використовувались для визначення кількісного складу різноманітних

вин. Час відгуку деяких біосенсорів не перевищував 100 [14, 19, 44, 51, 52] і навіть 20 с [12, 17, 29, 54], а для більшості датчиків становив 2 — 5 хв. При цьому результати, отримані при аналізі вин із застосуванням біосенсорів, демонструють високу кореляцію з даними, одержаними за допомогою класичних методів дослідження.

Проте, незважаючи на велику кількість публікацій про розробку біосенсорів, призначених для аналізу вина, лише декілька із цих систем є дійсно придатними для промислового застосування та комерційного виробництва. У цій роботі аналізуються розроблені на даний момент лабораторні прототиби біосенсорів, що можуть бути використані при аналізі вина та виноматеріалу.

2. Ферментні біосенсори для аналізу спиртів

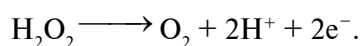
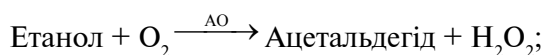
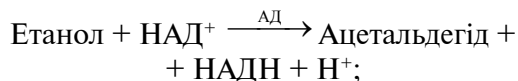
Кількісне визначення етанолу у винах.

Етанол є основним продуктом спиртового бродіння, який утворюється дріжджами при зброджуванні цукрів [55]. Контроль його вмісту у винах є обов'язковим, адже саме етанол визначає токсичні та калоричні властивості алкогольних напоїв [1]. Крім того, концентрація етанолу у середовищі впливає на розвиток дріжджових культур під час ферментації вина [11]. Тому оцінка його кількості, що міститься у винах, є актуальною на всіх стадіях виноробства [21, 56].

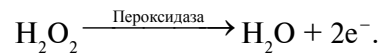
У Табл. 1 представлено порівняльну характеристику амперометричних ферментних біосенсорів для аналізу етанолу у вині, створених протягом останніх років.

Як видно із таблиці, біосенсор для визначення етанолу може бути розроблений на основі двох ферментів: алкогольдегідрогенази (АД) або алкогольоксидази (АО).

Робота амперометричних біосенсорів на основі іммобілізованих АД [13] та АО [57] базується на таких ферментативних реакціях:



При використанні АО для розщеплення пероксиду водню при низьких потенціалах може також застосовуватися додатковий фермент — пероксидаза [8, 20]:



Амперометричні біосенсори для аналізу етанолу у винах, створені на основі АО, характеризуються діапазонами лінійної залежності відгуку від концентрації етанолу до 3 [15] і 5 мМ [21]. При використанні іммобілізованої АД верхня межа лінійного діапазону розроблених датчиків сягає 10 мМ етанолу [13].

Мінімальна кількість етанолу, яка може бути визначена за допомогою розроблених амперометричних біосенсорів на основі АД, складає 0,001 мМ [10], а на основі АО — 0,01 мМ [15, 17].

Стабільність датчиків на основі АД при зберіганні становить до 90% через місяць [14], операційна стабільність — до 95% після 350 вимірювань [13].

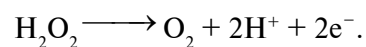
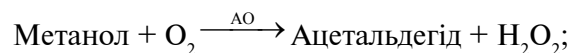
Біосенсори з іммобілізованою АО характеризуються операційною стабільністю у 98% після 90 вимірювань [17] та демонструють до 86,6% активності через три місяці зберігання [18].

Результати проведених за допомогою розроблених біосенсорів аналізів етанолу у вині демонструють високу кореляцію з даними класичних методів дослідження — газової хроматографії [18], методу дистиляції ($r = 0,995$), ферментативного ($r = 0,995$) [21] та рефрактометричного ($r = 0,920$) аналізу [58].

Кількісне визначення метанолу у винах.

Необхідність строгого контролю вмісту метанолу у алкогольних напоях обумовлена його токсичною дією (у високих концентраціях) на організм людини [56].

Біосенсорне визначення метанолу у вині проводять звичайно із застосуванням ферменту алкогольоксидази [16, 20], який каталізує наступну реакцію:



Розроблені на основі алкогольоксидази біосенсори здатні детектувати від 0,04 мМ [16] метанолу та характеризуються широкою лінійною залежністю величини відгуку від концентрації

Таблиця 1

Ферментні амперометричні біосенсори для аналізу етанолу у вині

Фермент	Матеріал робочого електрода	Метод іммобілізації	Границя визначення, мМ	Лінійна ділянка визначення, мМ	Стабільність	Джерело
хіно-гемо-протеїн-залежна АД	графіт	Осмії-модифікований редокс полімер як медіатор з використанням полі (етиленгліколь) дигліцидилового ефіру	0,001	0,001 — 0,25	100% через 100 годин	[10]
пірроло-хінолін хінон-залежна АД	графіт	Осмії-модифікований редокс полімер як медіатор з використанням полі (етиленгліколь) дигліцидилового ефіру	0,0012	0,0025 — 0,25	80% через місяць	[11]
АД	вуглець	Фізичне введення ферменту у вуглецевий композит електрода; додавання кофактора НАД ⁺ до робочого розчину	0,013	0,013 — 1,5	50% через тиждень	[12]
АД	вуглець	Адсорбція ферменту, кофактора НАД ⁺ та нерозчинної солі Meldola's Blue як медіатора на силкатний гел, модифікований оксидом ніобію	0,1	0,1 — 10	95% після 300 вимірювань	[13]
АД	графітовий композит, модифікований медіатором та кофактором НАД ⁺	Адсорбція розчину ферменту та полі(етиленгліколю) на поверхню електрода; після підсушування нанесення додаткової діалізної мембрани	0,014	0,014 — 4	90% через місяць	[14]
АО	платина	Іммобілізація ферменту у полікарбамойд-сульфонатний гідрогель	0,01	0,01 — 3	50 % через 18 діб	[15]
АО	графітово-тефлонний композит	Хімічне включення ферменту з ферроценном у матеріал електрода	0,02	0,02 — 2	100% через 15 діб	[16]
АО	модифіковане золотом	Перехресне зшивання ферменту з глутаровим альдегідом, використовуючи бічаний сироватковий альбумін	0,01	0,01 — 0,75	98% після 90 вимірювань	[17]
АО	комерційний кисневий електрод	Іммобілізація ферменту з хітозаном у підшкаралупну мембрану яйця	0,03	0,06 — 0,8	86,6% через 3 місяці	[18]
АО	графітово-епоксидний композит	Іммобілізація ферменту у желатинову мембрану, використовуючи глутаровий альдегід	0,025	0,025 — 0,025	100% після 40 вимірювань	[19]
АО + пероксидна хрона	платина	Електрохімічне нанесення в осмії-вмісній полімери	-	до 2	50% через 16 діб	[20]
АО	платина	Електрохімічне нанесення у полімері Резидроль	0,08	0,08 — 5	60% через місяць	[21]

метанолу — до 0,8 [16] та 1 мМ [20]. Створені датчики повністю зберігали свою вихідну активність через 15 діб після іммобілізації ферменту [20].

Проте аналіз вина за допомогою розробленого метанольного біосенсора не був успішним, тому що вміст метанолу у пробах вина, що досліджувалися, був значно нижчим за мінімальну межу детекції датчика [16].

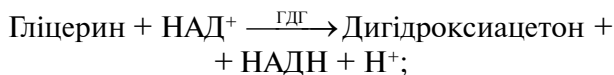
Кількісне визначення гліцерину у винах.

Гліцерин за кількістю є другим після етанолу компонентом вина. Від вмісту цього триатомного спирту залежать смак, маслянистість, солодкість та м'якість алкогольних напоїв [26]. Крім того, за фактичною кількістю гліцерину можна судити про натуральність походження вин [59].

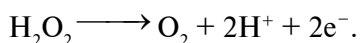
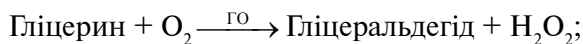
Порівняльну характеристику ферментних біосенсорів для аналізу гліцерину у вині, створених протягом останнього часу, наведено у Табл. 2.

Існує декілька варіантів розробки гліцеринового ферментного біосенсора.

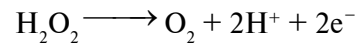
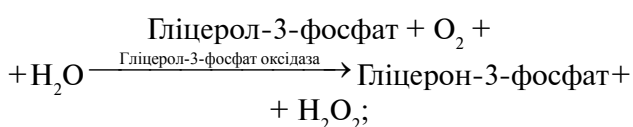
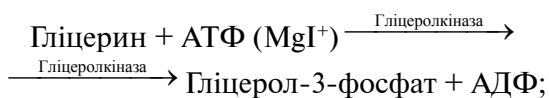
По-перше, для цієї мети можна застосовувати фермент гліцеролдегідрогеназу (ГДГ), який каталізує наступну реакцію [11]:



По-друге, у чутливу мембрану може бути іммобілізована гліцеролоксидаза (ГО), в результаті чого на ферментному електроді відбуватиметься реакція [26]:



І, по-третє, для біосенсорного аналізу гліцерину можна використовувати два ферменти — гліцеролкіназу та гліцерол-3-фосфат оксидазу, які забезпечують здійснення наступних перетворень [25]:



Розроблені на основі усіх трьох підходів датчики характеризуються широкими лінійними діапазонами залежності відгуків від концентрації гліцерину: 0,0003 — 0,3 мМ (фермент ГДГ) [22], 0,0005 — 0,5 мМ (ферменти гліцеролкіназа та гліцерол-3-фосфат оксидаза) [25], 0,05 — 25,6 мМ (фермент ГО) [26].

Стабільність сенсорів, створених на основі ГДГ та гліцеролкінази, коіммобілізованої з гліцерол-3-фосфат оксидазою, становить 80 — 100% через місяць [11, 25]. Біосенсор з іммобілізованою ГО демонструє 75% активності через 15 днів [26].

Датчик на основі ГДГ, про розробку якого повідомляється у роботі [22], зберігає 100% своєї вихідної активності після проведення 900 вимірювань.

Розроблені біосенсори були успішно використані для проведення аналізів гліцерину у вині [11, 24] та у суслі протягом його ферментації [25]. Дані щодо вмісту гліцерину у вині, отримані біосенсорним та спектрофотометричним методами, демонструють високу кореляцію [11].

3. Ферментні біосенсори для аналізу вуглеводів

Кількісне визначення глюкози у винах.

Вуглеводи грають важливу роль у формуванні органолептичних якостей вина, вони пом'якшують і збагачують смак, покращують аромат та колір вин [54]. Аналіз концентрації глюкози має істотне значення у процесі виноробства не лише через її вплив на смак вина, але й тому, що глюкоза є джерелом вуглецю для дріжджів, які здійснюють ферментацію, та субстратом, що лімітує їх ріст [11].

У Табл. 3 представлено порівняльну характеристику ферментних біосенсорів для аналізу глюкози у вині, створених протягом останніх років.

Біосенсори, призначені для аналізів глюкози, найчастіше розробляють на основі двох ферментів — глюкозодегідрогенази (ГД) або глюкозооксидази (ГОД). Іммобілізована разом з медіатором ГД забезпечує протікання наступних перетворень [29]:

Таблиця 2

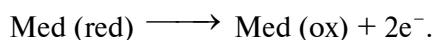
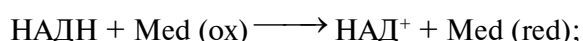
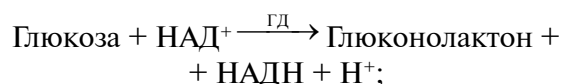
Ферментні біосенсори для аналізу гліцерину у вині

Фермент	Матеріал робочого електрода	Метод іммобілізації	Границя визначення, мМ	Лінійна ділянка визначення, мМ	Стабільність	Джерело
піроло-хінолін хінон-залежна ГДГ	графіт	Осмії-модифікований редокс полімер як медіатор з використанням полі (етилентіол) дигліцидилового ефіру	0,001	0,001 — 0,2	80% через місяць	[11]
ГДГ	вуглець, модифікований медіаторами Meldola's Blue, нілльською блакиттю або толуїдиновим синім	Адсорбція розчину ферменту та кофактора НАД ⁺ на поверхню електрода; Іммобілізація ферменту та кофактора НАД ⁺ в желатиновій мембрані	-	до 4 до 10	-	[23]
піроло-хінолін хінон-залежна ГДГ	графіт	Іммобілізація ферменту у глутаровому альдегіді	0,0005	0,002 — 1	48 — 9% через тиждень	[24]
Гліцерол-кіназа + гліцерол-3-фосфат оксидаза	платина	Перехресне зшивання ферменту з глутаровим альдегідом, використовуючи біочайний сироватковий альбумін; нанесення додаткової нейлонової мембрани для фізичної підтримки чутливої мембрани	0,0005	0,0005 — 0,5	100% через місяць	[25]
ГО	платина	Електрохімічна полімеризація у полімері полі(3,4-етилентіоксигіафен)	0,05	0,05 — 25,6	75% через 15 днів	[26]
ГДГ та НАДН оксидаза	Хемілюмінесцентне визначення в проточному реакторі	Коіммобілізація ферментів у матрицю полі (вініл алкоголю)	0,0003	0,0003 — 0,3	100% після 900 вимірювань	[22]

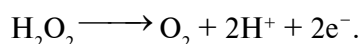
Таблиця 3

Ферментні біосенсори для аналізу глюкози у вині

Фермент	Матеріал робочого електрода	Метод іммобілізації	Границя визначення, мМ	Лінійна ділянка визначення, мМ	Стабільність	Джерело
піролюксінолін хінон-залезна ГД	графіт	Осмії-модифікований редокс полімер як медіатор з використанням полі (етилен-гліколь) дигліцидилового ефіру	0,009	0,02 — 0,8	80% через місяць	[11]
ГД та діафраза	вуглець	Іммобілізація розчинів ферментів та НАД ⁺ в осмії-модифікований редокс полімер як медіатор з використанням полі (етиленгліколь) дигліцидилового ефіру	0,01	0,01 — 0,8	90% через тиждень, 30% через 2 тижня	[29]
ГОД	графітовий композит, модифікований медіатором	Нанесення розчину ферменту та полі(етиленгліколю) на поверхню електрода; після підсушування нанесення додаткової діалізної мембрани	0,03	0,03 — 15	100% через місяць	[14]
ГОД	графітово-тефлоний композит	Хімічне включення ферменту з ферроцентром у матеріал електрода	0,04	0,1 — 3,2	100% через 15 діб	[16]
ГОД та пероксидаза хрому	вуглець	Перехресне зшивання ферментів з глутаровим альдегідом, використовуючи бічачий сироватковий альбумін	0,0044	0,0049 — 0,049	-	[30]
ГОД	платина	Електрополімеризація у полі (о-фенілендіаміні)	0,94	0,94 — 25	100% через місяць або після 120 вимірювань	[31]
ГОД	вуглець	Перехресне зшивання ферменту з глутаровим альдегідом, використовуючи бічачий сироватковий альбумін	0,06	0,06 — 1,5	Падіння активності спостерігається через 5 днів	[32]
ГОД	платина	Іммобілізація у вуглецеву пасту з мінеральною олією; Іммобілізація у вуглецеву пасту з полі(хлоротрифлуоретиленовою) олією	-	0 — 20 0 — 25	-	[33]
ГОД	комерційний кисневий електрод	Іммобілізація ферменту у підшкаралупну мембрану яйця із застосуванням глутарового альдегіду	0,01	0,01 — 1,3	85,2% через 4 місяці	[34]
ГОД	кисень-чутливий отгрод	Іммобілізація ферменту у внутрішню бамбукову мембрану із застосуванням глутарового альдегіду	0,058 мМ	0,058 — 0,6 мМ	95% через 8 місяців	[35]



Реакція, яку каталізує ГОД, має вигляд [60]:



Інколи для розщеплення пероксиду водню може використовуватися пероксидаза, коімобілізована з ГОД [30].

Як видно із Табл. 3, розроблені біосенсори здатні детектувати від 0,009 мМ (для ГД) [11] та від 0,0044 мМ (для ГОД) [30] глюкози. Верхня межа лінійного діапазону для датчиків на основі ГД становить 0,8 мМ [11, 29], на основі ГОД — 25 мМ [31, 33].

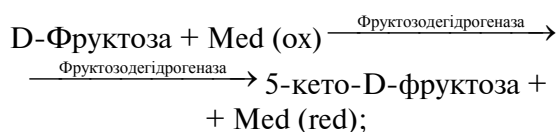
Датчики з іммобілізованою ГОД зберігають 100% своєї активності через місяць [14, 31], 95% через 8 місяців [35]. Стабільність біосенсорів, створених на основі ГД, є значно нижчою: 80% через місяць [11] і 30% через 2 тижня [29].

Результати аналізів вин із застосуванням розроблених глюкозних біосенсорів демонструють високу кореляцію із даними рефрактометричного ($r = 0,978$ [58], $r = 0,9778$ [61]) та спектрофотометричного методу дослідження [11].

Кількісне визначення фруктози у винах.

Фруктоза, як і інші вуглеводи, впливає на смак та аромат алкогольних напоїв і міститься у винах навіть у більшій кількості, ніж глюкоза [55].

Амперометричний біосенсор для кількісного аналізу фруктози, як зазначається, можна створити на основі ферменту фруктозодегідрогенази, використовуючи у роботі медіатор [38]:



Лінійний діапазон створених датчиків був 0,01 — 1 мМ [38] та 0,01 — 10 мМ [14]. Іммо-

білізований фермент демонстрував 100% від вихідної активності через тиждень [36] і навіть через місяць зберігання [14].

Розроблені біосенсори були успішно застосовані для аналізу фруктози у винах [14, 36]. Результати досліджень відповідали даним, одержаним за допомогою класичного колориметричного методу [36].

4. Ферментні біосенсори для аналізу органічних кислот

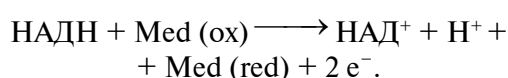
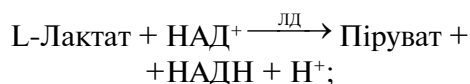
Кількісне визначення лактату у винах.

Контроль вмісту органічних кислот є актуальним на всіх етапах винного виробництва, бо кислотність — один із основних показників хімічного складу і смакових якостей вина. Наявність або відсутність органічних кислот у пробі, а також їхній кількісний вміст і співвідношення дозволяють визначати якість напоїв та їх фальсифікацію, контролювати ферментативні процеси та проводити кореляцію зі смаком кінцевого продукту [62].

Відомості про концентрацію молочної кислоти — лактату — у винному виробництві мають істотне практичне значення. Постійний, одночасний та вибірковий моніторинг лактату є необхідним, тому що цей параметр визначає не тільки якість і особливий аромат вина, але також дозволяє контролювати процес ферментації [7, 41].

У Табл. 4 представлено порівняльну характеристику амперометричних ферментних біосенсорів для аналізу лактату у вині, розроблених протягом останніх років.

Найчастіше для створення лактатних біосенсорів використовуються три ферменти — лактатдегідрогеназа (ЛД), лактатоксидаза (ЛОД) або флавоцитохром b_2 (ФЦ b_2). Робота біосенсора, розробленого з використанням ЛД, базується на даній реакції [40]:



Імобілізована ЛОД забезпечує протікання наступного перетворення [7]:

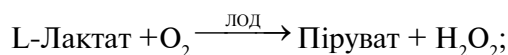
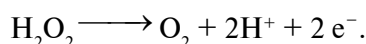


Таблица 4

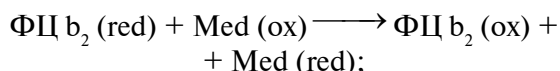
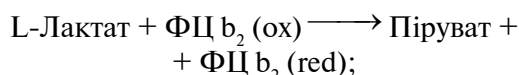
Ферментні амперометричні біосенсори для аналізу лактату у вині

Фермент	Матеріал робочого електрода	Метод іммобілізації	Границя визначення, мМ	Лінійна ділянка визначення, мМ	Стабільність	Джерело
ЛД	графітовий композит, модифікований медіатором та кофактором НАД ⁺	Нанесення розчину ферменту та полі(етиленгліколю) на поверхню електрода; після підсушування нанесення додаткової діалізної мембрани	0,011	0,011 — 1,5	100% через 1 місяць	[14]
ЛД	графітовий композит з медіатором	Нанесення розчину ферменту, поліетиленіміну та нафйону на поверхню електрода; кофактор НАД ⁺ додавався до робочого розчину	0,05	0,05 — 1	74% через 2 тижні	[28]
ЛД	графітовий композит з кофактором НАД ⁺	Нанесення розчину ферменту, тексаціаноферрату та полі(етиленгліколю) на поверхню електрода; після підсушування нанесення додаткової діалізної мембрани	0,01	0,01 — 1,3	90% через 5 місяців	[39]
ЛД	вуглецевий електрод, модифікований за допомогою нерозчинної солі Meldola's Blue	Нанесення ферменту з кофактором НАД ⁺ на поверхню модифікованого електрода	0,05	0,1 — 1	75% через 2 тижні	[40]
ЛОД	золото, відполіроване діамантового пастою	Адсорбція ферменту на поверхню золотого електрода; Ковалентне пришивання ферменту до золотого електрода, модифікованого 3,3-дитіодипропіонат ді(N- сукцинімідил ефіром) (DTSP); медіатор гідроксиметилферроцен в обох випадках додавався у робочий розчин	0,01 0,04	0,01 — 0,3 0,04 — 0,2	50% після першого вимірювання, залишається постійною протягом місяця	[41]
ЛОД	платина	Іммобілізація ферменту у нейлонову сітку з використанням глютарового альдегіду та фенозин метасульфату як медіатора; нанесення додаткових целюлозно-ацетатної та полікабонатної мембран	0,002	0,005 — 1	35% після 150 вимірювань	[42]
ЛОД та пероксидаза	графітово-тефлонний композит	Інкorporація ферменту та медіатора ферроцену на поверхню електрода	1,4	-	Немає суттєвого падіння активності після 6 місяців зберігання	[43]
ЛОД, ЛОД та пероксидаза хрому	комерційний кисневий електрод	Хімічне зв'язування ферментів з нейлоновою мембраною; нанесення двох додаткових діалізних мембран	0,02	0,045 — 2,68	70% після 200 аналізів	[44]
ЛОД	платина	Електрохімічна полімеризація у полі(3,4-етилендіоксифені); ксифафені);	0,05 0,004	0,05 — 1,6 0,004 — 0,5	30% через 25 діб 20% через 23 доби	[7]
ФЦ b ₂	графіт	Фізична адсорбція у полімері Резидроль	-	-	50% через 5 діб	[45]
		Електрохімічне осадження ферменту з осмії-вмісними редокс-полімерами				



Інколи для розщеплення пероксиду використовується пероксидаза, коїмобілізована з ЛОД [43, 44].

У випадку застосування ФЦ b₂ ферментативні реакції описуються наступною схемою [45]:



Біосенсиори, сконструйовані на основі ЛД, здатні детектувати від 0,01 мМ лактату [14, 39]. Використання у роботі ЛОД дозволяє визначати від 0,002 мМ [42] та від 0,004 мМ лактату [7].

Обидва типи біосенсорів демонструють значний лінійний діапазон: 0,011 — 1,5 мМ (датчик з іммобілізованою ЛД) [14] та 0,005 — 1 мМ (датчик з іммобілізованою ЛОД) [42].

Максимальна стабільність створених на основі ЛД та ЛОД біосенсорів у часі становить 90 — 100% після 5 — 6 місяців зберігання [39, 43]. Біосенсиори, розроблені із використанням ФЦ b₂, демонструють 50% від початкової активності через 5 діб після іммобілізації ферменту [45].

Результати аналізу лактату у винах, отримані із застосуванням ферментних біосенсорів, демонструють високу кореляцію з результатами класичних методів дослідження: спектрофотометричного ($r = 0,992$ [42]) [41, 44], ферментативного ($r = 0,999$) [45] та хроматографічного [7, 39].

Кількісне визначення малату у винах.

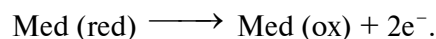
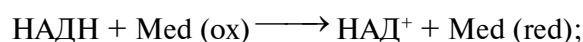
Малат (яблучна кислота) надає смаку вина характерні відтінки, проте його підвищений вміст у вині викликає присмак зелених ягід. Тому існує необхідність контролю концентрації малату у винах [59].

Порівняльну характеристику амперометричних ферментних біосенсорів для аналізу малату у вині, створених протягом останнього часу, представлено у Табл. 5.

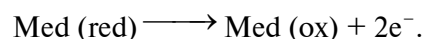
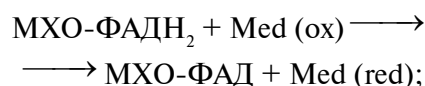
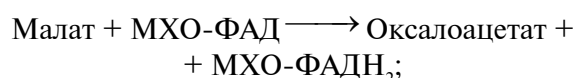
Біосенсиори для аналізу малату у вині найчастіше розробляють з використанням малатдегі-

дрогенази (МД) або малат-хінон оксидоредуктази (МХО).

Робота біосенсорів, створених на основі МД (іноді коїмобілізованої з пероксидазою [44]), базується на наступних реакціях [39]:



Робота біосенсорів з іммобілізованою МХО заснована на реакціях [46]:



Створені на основі МД та МХО датчики дозволяють визначати від 0,003 [42] — 0,005 мМ [46] до 0,75 [46] — 2 мМ [44] малату.

Біосенсиори з іммобілізованою МД зберігають 100% своєї активності через 5 місяців після іммобілізації ферменту [39] та 90% активності після проведення 150 вимірювань [42]. Біосенсор, створений на основі МХО, демонструє 100% вихідної активності після проведення 10 вимірювань [46].

Результати аналізу малату у винах, отримані із застосуванням ферментних біосенсорів, демонструють високу кореляцію з результатами спектрофотометричного ($r = 0,996$ [42]) [44] та хроматографічного методів дослідження [39].

Кількісне визначення ацетату у винах.

Визначення концентрації ацетату (оцтової кислоти) дозволяє виявити фальсифікати вина, що представляють собою суміш виноградного соку, що не добродив, із спиртом і цукром. У таких “винах” оцтова кислота міститься у кількостях, характерних для виноградного суслу [1]. Крім того, вміст оцтової кислоти в натуральних винах лімітується, тому що вона значно впливає на органолептичні властивості вина та надає різкість його смаку [55].

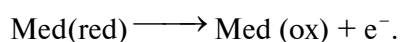
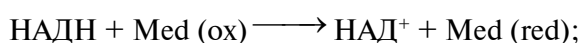
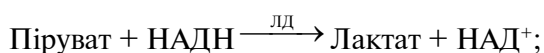
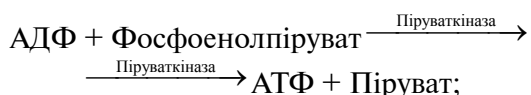
Як зазначається, амперометричний біосен-

Таблиця 5

Ферментні амперометричні біосенсори для аналізу малату у вині

Фермент	Матеріал робочого електрода	Метод іммобілізації	Границя визначення, мМ	Лінійна ділянка визначення, мМ	Стабільність	Джерело
МД	графітовий композит, модифікований медіатором та кофактором НАД ⁺	Нанесення розчину ферменту та полі(етиленгліколю) на поверхню електрода; після підсушування нанесення додаткової діалізної мембрани	0,015	0,015 — 1,5	90% через місяць	[14]
МД та діафраза	графітовий композит з кофактором НАД ⁺	Нанесення розчину ферменту, гексаціаноферрату та полі(етиленгліколю) на поверхню електрода; після підсушування нанесення додаткової діалізної мембрани	-	до 1,1	100% через 5 місяців	[39]
МД	платина	Іммобілізація ферменту із застосуванням глютарового альдегіду та амінопропілу; кофактор додавався до робочого розчину	0,003	0,01 — 0,4	90% після 150 вимірювань	[42]
МД та пероксидаза хрому	комерційний кисневий електрод	Хімічне зв'язування ферменту з нейлоною мембраною; нанесення двох додаткових діалізних мембран	0,037	0,067 — 2	70% після 200 вимірювань	[44]
Малат-хінон оксидоредуктаза	графіт з додаванням медіатора	Нанесення розчину ферменту та полімеру полі (вініл алкохолу) на поверхню електрода	0,005	0,005 — 0,75	100% після 10 вимірювань	[46]

сор для аналізу ацетату у винах був створений на основі трьох ферментів: ацетаткінази, піруваткінази та лактатдегідрогенази [47]. Робота такого біосенсора заснована на наступних ферментативних реакціях:



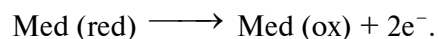
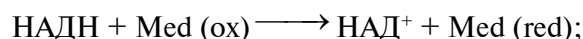
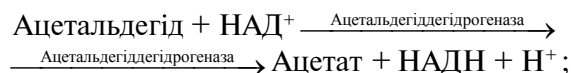
Даний ацетатний біосенсор характеризується мінімальною концентрацією ацетату, що визначається, — 0,13 мМ та лінійним діапазоном роботи у межах 0,2 — 8 мМ. Після двох годин неперервної роботи датчик зберігає 93% від початкової активності, а ще через 4 години — 79%.

Розроблений біосенсор був успішно застосований для кількісного визначення ацетату у винах. Отримані з його допомогою результати відповідали результатам, одержаним із застосуванням класичного ферментативного визначення ацетату [47].

5. Ферментні біосенсори для аналізу альдегідів

Найголовнішим альдегідом вина є ацетальдегід, вміст якого складає 90% від кількості усіх вищих аліфатичних альдегідів [63]. У невеликих кількостях він привносить приємні відтінки до смаку вин типу марсали, проте для більшості вин ацетальдегід є небажаним: він надає різкість аромату, а при переокисненні до оцтової кислоти — неприємний смак [55]. Тому контроль вмісту ацетальдегіду є актуальним при виробництві вина.

Біосенсор для визначення ацетальдегіду у вині може бути розроблений на основі ферменту ацетальдегіддегідрогенази [27, 28], який каталізує перетворення ацетальдегіду на ацетат. В основі роботи такого біосенсора лежать наступні реакції із застосуванням медіатора [28]:



Сконструйовані на основі іммобілізованої ацетальдегіддегідрогенази біосенсори здатні детектувати від 0,026 до 0,1 мМ [27] та від 0,001 до 0,5 мМ [28] ацетальдегіду.

Стабільність створених датчиків при зберіганні є досить високою — через 3 тижні після іммобілізації ацетальдегіддегідрогеназа демонструє 83% від початкової активності [27], через 150 днів — 50% [28].

Результати проведених із застосуванням біосенсора аналізів вина демонструють високу кореляцію з даними, отриманими за допомогою спектрофотометричного визначення ацетальдегіду [28].

6. Кількісне визначення фенольних сполук у винах

Поліфеноли є нечисленними за кількістю, проте надзвичайно важливими компонентами вина, тому що ці сполуки володіють потужною антиоксидантною [48] та протипухлинною активністю [49]. Крім того, фенольні компоненти впливають на органолептичні властивості вин, надаючи їм приємного аромату та присмаку [49].

Біосенсори, призначені для кількісного визначення фенольних сполук вина, можуть бути розробленими на основі двох ферментів: тирозинази [48, 50, 51] та лаккази [49].

Тирозиназа каталізує дигідроксилювання монофенолів до о-дифенолів та окиснення дифенольних сполук до відповідних о-хінонів, тобто володіє крезолазною та катехолазною активністю. Субстратами цього ферменту є безліч фенольних компонентів вина [50].

За допомогою біосенсора, створеного на основі тирозинази, можна проводити визначення фенолу, катехолу, кофеїнової, галової кислот та інших поліфенолів у широких межах концентрацій [48].

Тирозиназний біосенсор, як зазначається, демонструє 60 — 45% від вихідної активності після проведення 10 вимірювань [50].

Дані щодо вмісту поліфенолів у винах, отри-

мані за допомогою біосенсора, демонструють високу кореляцію із результатами спектрофотометричного аналізу вин із застосуванням реактиву Фоліна ($r = 0,990$) [48].

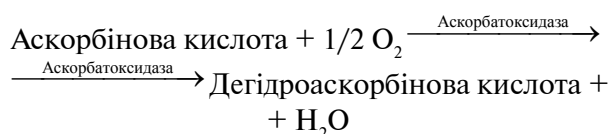
Інший фермент, який застосовується при розробці біосенсорів для аналізу поліфенолів, — це лаккази. Вона є поліфенолоксидазою, що каталізує окиснення 1,2-дигідроксибензенової групи флаванолів. Продукт ферментативного окиснення, 1,2-бензохінон, детектується після відновлення на електроді. Механізм даної реакції досі цілком не з'ясований. Вважається, що фермент спочатку повністю відновлюється киснем, який у свою чергу відновлюється до води, що супроводжується формуванням радикальних інтермедіатів [49].

Біосенсор на основі іммобілізованої лаккази дає змогу проводити кількісне визначення катехіну та кофеїнової кислоти у межах 0,002 — 0,014 мМ. Щоправда, результати аналізів катехіну та кофеїнової кислоти у винах, отримані за допомогою розробленого біосенсора, відрізнялись від даних методу високоефективної рідинної хроматографії. Цю розбіжність результатів можна пояснити впливом інших фенольних сполук, наявних у вині, на роботу лакказного біосенсора для визначення катехіну та кофеїнової кислоти [49].

7. Кількісне визначення аскорбінової кислоти у винах

Аскорбінова кислота міститься у винах (особливо у витриманих) у невеликій кількості. Дана сполука, крім того, що має корисні вітамінні властивості, запобігає окисненню багатьох компонентів вина, тим самим підтримуючи стабільність його складу [55].

У повідомленні про розробку амперометричного біосенсора, призначеного для аналізу аскорбінової кислоти у винах, вказується, що він був створений на основі ферменту аскорбатоксидази, який каталізує наступну реакцію [51]:



Детекція аскорбату здійснювалася шляхом визначення різниці амперометричного сигналу від кисень-чутливого електрода при наявності та відсутності у електрохімічній комірці проби.

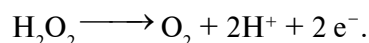
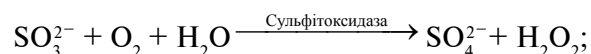
У результаті наведеної вище реакції сигнал біосенсора змінюється через поглинання кисню, і ця зміна є пропорційною концентрації аскорбінової кислоти у пробі.

Розроблений на основі аскорбатоксидази біосенсор був успішно застосований для проведення аналізу аскорбінової кислоти у вині [51].

8. Кількісне визначення сульфідів у винах

Присутність сульфідів та його кількість у алкогольних напоях має важливе значення, тому що дана речовина, що належить до антиоксидантів, сприяє їх тривалому зберіганню. Водночас сульфід може виступати як інгібітор ферментативної та мікробіальної активності, яка спостерігається під час ферментації суслу та дозрівання вина. Тому чіткий контроль за його вмістом у винах є актуальним на різних стадіях виноробства [52].

Біосенсорне визначення сульфідів зазвичай засновується на реакції, яка каталізується ферментом сульфідоксидазою [52]:



Біосенсори, створені на основі іммобілізованої сульфідоксидази, характеризуються широкими лінійними діапазонами роботи (0,01 — 0,1 мМ [14] та 0,002 — 0,3 мМ сульфідів [52]).

Як зазначається, сульфідний біосенсор демонструє 70% від початкової активності через місяць зберігання [14] і 15% — через три місяці [52].

Створені датчики були успішно використані для аналізу сульфідів у різних зразках вин [14, 51, 52]. Коефіцієнт кореляції між результатами, отриманими із застосуванням біосенсора, та результатами класичного титрувального методу визначення сульфідів становить 0,967 [52].

9. Недоліки ферментних біосенсорів для аналізу вина та варіанти їх усунення

Найбільш частими недоліками створених біосенсорів, які перешкоджають їхньому широкому вжитку у харчовій промисловості, і у виноробстві зокрема, є:

1. Обмежений час використання біосенсорів через нестійкість біологічного матеріалу;

2. Залежність їхньої роботи від вільно дифундуючих медіаторів;

3. Вимога наявності додаткових кофакторів [6].

Існує декілька шляхів усунення зазначених недоліків ферментних біосенсорів.

Підвищення стабільності біологічного матеріалу.

Підвищення стабільності ферменту можна досягти, оптимізуючи методи та прийоми його іммобілізації на поверхню електрода [35], а також досліджуючи вплив на функціонування ферменту компонентів чутливої мембрани [64] та стабілізаторів [40]. Крім того, на збереження активності іммобілізованого ферменту у часі може впливати вибір типу електрода, який застосовується при розробці біосенсора [65].

Наприклад, у роботах [39, 43] завдяки підбору оптимального композитного матеріалу електрода, у який було іммобілізовано фермент, були досягнуті 90 — 100% показники стабільності біосенсорів навіть через 5 — 6 місяців після їх створення.

Ще одним цікавим способом підвищення стабільності іммобілізованих ферментів у часі є їхнє включення не у штучні полімерні мембрани, а у природні біоматеріали (наприклад, у підшкаралупну мембрану яйця чи у внутрішню бамбукову мембрану) [18]. Як вважається, подібні мембрани являють собою ідеальну біоплатформу для іммобілізації ферменту, і таке біополімерне мікрооточення є більш комфортним для його тривалого функціонування. Дійсно, розроблений на основі підшкаралупної мембрани яйця біосенсор демонстрував 86,6% від початкової активності через 3 місяці [18] і 85,2% активності через 4 місяці [34] зберігання, а при іммобілізації у внутрішню бамбукову мембрану фермент зберігав 95% активності через 8 місяців після створення біосенсора [35].

При тривалому зберіганні біосенсорів їхню стабільність можна підвищити, підібравши оптимальні умови зберігання — температуру оточуючого середовища, відсутність або наявність буфера, його склад та рН, присутність домішок тощо [25, 66]. У роботі [25] завдяки варіюванню умов зберігання створених біосенсорів вдалося досягти збільшення їхньої стабільності з однієї доби (при зберіганні датчиків у сухому стані) до одного місяця (при зберіганні у стабілізуючому розчині підбраного складу).

Операційна стабільність деяких ферментних біосенсорів, розроблених на сьогоднішній день, теж є надзвичайно високою: ферментні датчики демонструють 90 — 100% своєї вихідної активності після проведення 90 [17], 120 [31], 150 [42], 300 [13] і навіть 900 [22] аналізів.

Оптимізація медіаторних біосенсорів.

Біосенсори, робота яких заснована на використанні медіаторів, володіють певними перевагами у порівнянні з безмедіаторними біосенсорами, тому що при їх функціонуванні медіатор забезпечує ефективну передачу сигналу від ферменту до електрода, підвищуючи чутливість та селективність датчиків [6]. Проте одним з недоліків, що стримує розвиток біосенсорів на основі іммобілізованих медіаторів, є низька стабільність таких датчиків [9]. Приміром, біосенсор, розроблений на основі іммобілізації ферменту разом з медіатором у плівку глутарового альдегіду, протягом першої години після створення втрачає половину своєї вихідної активності через вимивання медіатора з чутливої мембрани [24].

Для вирішення цієї проблеми можуть застосовуватися різні підходи. У найпростішому випадку порошок медіатора змішується з вуглецевою пастою або графітовою пудрою і в такий спосіб виготовляється електрод, на який уже потім наноситься фермент [14, 16, 28, 43, 46]. В інших варіантах медіатори просто адсорбують на поверхню електрода [39]. Крім того, при застосуванні обох підходів може використовуватися діалізна мембрана, що охороняє компоненти від вимивання в розчин [14, 39].

Також медіатор при проведенні аналізу може додаватися і до робочого розчину [41], проте такий варіант, звичайно, є нетехнологічним [9].

У роботах [10, 11, 20, 29, 45] у ролі медіатора виступав осмій-вмісний редокс полімер, яким модифікувалася поверхня електродів. Дана технологія виготовлення датчиків, по-перше, сприяє міцному з'єднанню медіатора з електродом, а, по-друге, забезпечує оптимальну підтримуючу основу для іммобілізації ферментів. Тим самим стабільність розроблених біосенсорів значно підвищується. Аналогічного ефекту можна досягти, застосовуючи модифікацію електродів за допомогою нерозчинної солі Meldola's Blue [13, 23, 40, 46, 67] та інших органічних барвників — метиленового зеленого, метиленового блакитного [67], толуїдинового

синього [23, 67, 68], нільської блакиті [23, 46], полі(нейтрально) червоного [27] тощо, які теж виступають і у ролі медіатора, і у ролі підтримуючої матриці для іммобілізації ферменту.

Крім того, існують шляхи підвищення ефективності перенесення сигналу від іммобілізованого ферменту до електрода і без використання медіаторів. У роботі [48] зазначається, що модифікація карбонового електрода золотими наночастками відіграє важливу роль при створенні датчика, тому що це забезпечує стабільну поверхню для іммобілізації ферменту та дозволяє здійснювати електрохімічну детекцію без необхідності у зовнішньому електрон-переносному медіаторі. У цьому випадку золоті наночастки можуть виступати у якості нанорозмірних медіаторів, які забезпечують електричну комунікацію між ферментом та матеріалом електрода і тим самим сприяють підвищенню чутливості біосенсора. Для досягнення тієї самої мети можна використовувати і інший тип модифікації електродів — їхню платинізацію [31].

Подолання проблем, пов'язаних з використанням екзогенного кофактора.

Велика кількість ферментних амперометричних біосенсорів для визначення тих чи інших субстратів була розроблена на основі відповідних дегідрогеназ. Проте датчики, створені із застосуванням іммобілізованих дегідрогеназ, мають суттєвий недолік: вони вимагають наявності у середовищі кофактора НАД⁺, що значно ускладнює аналіз і збільшує його собівартість [7, 21].

При розробці дегідрогеназного біосенсора кофактор НАД⁺ інколи додається у робочий розчин [12, 28, 42], проте подібний прийом не є технологічним. Також кофактор може бути іммобілізований у чутливу мембрану разом з ферментом [23, 29, 40]. Але при такому підході НАД⁺ здатен легко дифундувати з ферментативної мембрани, спричинюючи значне зниження чутливості біосенсора [23]. У результаті створений датчик вже через два тижні втрачає 70% своєї вихідної активності [29].

Тому більш ефективним методом іммобілізації кофактора НАД⁺ при розробці дегідрогеназних біосенсорів є його безпосереднє включення у матеріал електрода, на який потім наноситься чутлива мембрана з ферментом [14, 39]. Застосування даної технології забезпечує

збереження до 90% активності біосенсора через 5 місяців після його створення [39].

Альтернативним підходом, який дозволяє подолати зазначений недолік дегідрогеназних біосенсорів, є використання пірроло-хінолін хінон-залежних дегідрогеназ, які не вимагають наявності екзогенного НАД⁺, тому що мають у своєму складі кофактор пірроло-хінолін хінон, нековалентно приєднаний до апоферменту [11, 54]. Додатковою перевагою використання даних ферментів є те, що окремі представники пірроло-хінолін хінон-залежних дегідрогеназ демонструють ефективне пряме перенесення електронів від активного центру ферменту до електрода без застосування додаткових медіаторів [11].

Через неміцне приєднання кофактора до ферменту, біосенсиори на основі пірроло-хінолін хінон-залежних дегідрогеназ, як правило, не володіють високою стабільністю, а інколи виступають у ролі аналізаторів лише одноразового використання [54, 61]. Розробка та вдосконалення методів виділення та очистки пірроло-хінолін хінон-залежних дегідрогеназ дозволяє отримати ферменти з більш міцно зв'язаним кофактором і тим самим сприяє більш тривалому збереженню вихідної активності іммобілізованих ферментів у часі [61].

Також для розробки ферментних біосенсорів можуть застосовуватися хіно-гемопротейн-залежні дегідрогенази, які містять у своєму складі кофактор пірроло-хінолін хінон та декілька гемових груп, по ланцюгу яких електрони передаються від активного центру ферменту до електрода [10]. Стабільність біосенсора на основі хіно-гемопротейн-залежної дегідрогенази становить 100% після 100 годин неперервної роботи [10].

10. Висновки

В огляді наведено характеристику ферментних біосенсорів для кількісного визначення компонентів вина, які були створені протягом останніх років, та проаналізовано їхні основні переваги та недоліки.

Біосенсор є зручним інструментом для визначення широкого спектру речовин, який не потребує попередньої підготовки проби, складного устаткування та високої кваліфікації обслуговуючого персоналу. Крім того, завдяки використанню специфічних ферментів біосенсор

забезпечує високу селективність аналізу, а завдяки застосуванню сучасних досягнень в області мікроелектроніки, — його високу чутливість.

Важливо підкреслити, що чутливість амперометричних біосенсорів перевершує чутливість традиційних методів аналізу вина. Тому біосенсори можуть особливо успішно застосовуватися для аналізу тих вин, концентрація компонентів яких (головним чином вуглеводів та органічних кислот) є нижчою за ліміт детекції класичних методів — хроматографії та капілярного електрофорезу [1].

На даний час розроблено ряд лабораторних прототипів ферментних біосенсорів, призначених для кількісного аналізу майже усіх найголовніших компонентів вин. Вони дозволяють проводити визначення у досить широких діапазонах концентрацій та демонструють високу кореляцію результатів із даними традиційних методів аналізу вина.

До недоліків розроблених біосенсорів слід віднести обмежений час їхнього використання через нестійкість біологічного матеріалу та залежність їхньої роботи від медіаторів та екзогенних кофакторів, що ускладнює аналіз та підвищує його собівартість. Проте ці недоліки можна усунути завдяки оптимізації розроблених датчиків та умов їхнього зберігання.

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми “Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технічних потреб” та проекту УНТЦ 4378.

Список літератури

1. Горюшкіна Т.Б., Дзядевич С.В., Виноградні вина: класифікація, хімічний склад та традиційні методи визначення їхніх компонентів // Біотехнологія. — 2008. - Т.1.- в друці.
2. Справочник по виноделию под ред. Г.Г.Валуйко, В.Т.Косюры.- Симферополь: Таврида, изд. 2-е, перераб. и доп., 2000. — 263с
3. Хімія і біохімія вина. Лабораторний практикум: Навч. посіб., В.О.Русаків та ін. За заг. ред. Є.П.Шольца-Кулікова.- Київ: УДУХТ, 2001. — 10 с.
4. Колеснов А.Ю., Ферментативный анализ качества продуктов питания // Вопросы питания. — 1997. №3. — С 21 — 25.
5. Malhotra B.D., Singhal R., Chaubey A., Sharma S.K., Kumar A., Recent trends in biosensors // Current Applied Physics. — 2005. — Vol. 5. — P. 92–97.
6. Castillo J., Gaspar S., Leth S., Niculescu M., Mortari A., Bontidean I., Soukharev V., Dorneanu S.A., Ryabov A.D., Csoregi E., Biosensors for life quality. Design, development and applications // Sensors and Actuators B. — 2004. — Vol. 102 — P. 179–194.
7. Шкотова Л.В., Горюшкіна Т.Б., Сластия Е.А., Солдаткін О.П., Тран-Мін К., Шовелон Ж.-М., Дзядевич С.В., Амперометричний біосенсор для аналізу лактату у вині та у виноградному суслі у процесі його ферментації // Укр.біохім.журнал. — 2005. — Т. 77, №5. — С. 123 — 130.
8. Варфоломеев С.Д., Биосенсоры // Соросовский образовательный журнал. — 1997. — №1. — С. 45 — 49.
9. Дзядевич С.В., Амперометрические биосенсоры. Основные принципы работы и особенности датчиков разных генераций // Биополімери і клітина. — 2002. — Т. 18, № 1. — С. 13 — 25.
10. Niculescu M., Erichsen T., Sukharev V., Kerenyi Z., Csoregi E., Schuhmann W., Quinohemoprotein alcohol dehydrogenase-based reagentless amperometric biosensor for ethanol monitoring during wine fermentation // Anal. Chim. Acta. — 2002. — Vol. 463, № 1. — P. 39 — 51.
11. Niculescu M., Mieliauskiene R., Laurinavicius V., Csoregi E., Simultaneous detection of ethanol, glucose and glycerol in wines using pyrroloquinoline quinone-dependent dehydrogenases based biosensors // Food Chemistry. — 2003. — Vol. 82. — P. 481 — 489.
12. Tsai Y.-C., Huang J.-D., Chiu C.-C., Amperometric ethanol biosensor based on poly(vinyl alcohol)—multiwalled carbon nanotube—alcohol dehydrogenase biocomposite // Biosensors and Bioelectronics. — 2007. — Vol. 22. — P. 3051 — 3056.
13. Santos A.S., Freire R.S., Kubota L.T., Highly stable amperometric biosensor for ethanol based on Meldola's blue adsorbed on silica gel modified with niobium oxide // Journal of Electroanalytical Chemistry. — 2003. — Vol. 547. — P. 135 — 142.
14. Miertus S., Katrlík J., Pizzariello A., Stred'ansky M., Svitel J., Svorc J., Amperometric biosensors based on solid binding matrices applied in food quality monitoring // Biosensors and Bioelectronics. — 1998. — Vol. 13, № 7 — 8. — P. 911 — 923.
15. Patel N.G., Meier S., Cammann K., Chemnitz G.C., Screen-printed biosensors using different alcohol oxidases // Sensors and Actuators B. — 2001. — Vol. 75, № 1 — 2. — P. 101 — 110.
16. Guzman-Vázquez de Prada A., Peca N., Parrado C., Reviejo A.J., Pingarron J.M., Amperometric multi-detection with composite enzyme electrodes // Talanta. — 2004. — Vol. 62. — P. 896 — 903.
17. Carelli D., Centonze D., De Giglio A., Quinto M., Zambonin P.G., An interference-free first generation alcohol biosensor based on a gold electrode modified by an overoxidised non-conducting polypyrrole film

- // *Anal. Chim. Acta.* — 2006. — Vol. 565. — P. 27 — 35.
18. *Wen G., Zhang Y., Shuang S., Dong C., Choi M.M.F.*, Application of a biosensor for monitoring of ethanol // *Biosensors and Bioelectronics.* — 2007. — Vol. 23, №1. — P. 121 — 129.
19. *Kirgoz U.A., Odaci D., Timur S., Merkoci A., Alegret S., Besun N., Telefoncu A.*, A biosensor based on graphite epoxy composite electrode for aspartame and ethanol detection // *Anal. Chim. Acta.* — 2006. — Vol. 570. — P. 165–169.
20. *Smutok O., Ngounou B., Pavlishko H., Gayda G., Gonchar M., Schuhmann W.*, A reagentless bienzyme amperometric biosensor based on alcohol oxidase/peroxidase and an Os-complex modified electrodeposition paint // *Sensors and Actuators B.* — 2006. — Vol. 113, №2. — P. 590 — 598.
21. *Шкотова Л.В., Сластия Е.А., Жулякова Т.А., Солдаткін О.П., Шуманн В., Дзядевич С.В.*, Амперометричний біосенсор для аналізу етанолу у вині та у виноградному суслі в процесі його ферментації // *Український біохімічний журнал.* — 2005. — Т. 77, № 1. — С. 96 — 103.
22. *Kiba N., Azuma N., Furusawa M.*, Chemiluminometric method for the determination of glycerol in wine by flow-injection analysis with co-immobilized glycerol dehydrogenase/NADH oxidase // *Talanta.* — 1996.—Vol.43.— P. 1761 — 1766.
23. *Laurinavicius V., Kurtinaitiene B., Gureiviciene V., Boguslavsky L., Geng L., Skotheim T.*, Amperometric glyceride biosensor // *Anal. Chim. Acta.*— 1996.— Vol. 330.— P. 159 — 166.
24. *Lapenaite I., Kurtinaitiene B., Razumiene J., Laurinavicius V., Marcinkeviciene L., Bachmatova I., Meskys R., Ramanavicius A.*, Properties and analytical application of PQQ-dependent glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter* sp. 33 // *Anal. Chim. Acta.* — 2005. — Vol. 549. — P. 140 — 150.
25. *Compagnone D., Esti M., Messia M.C., Peluso E., Paleschi G.*, Development of a biosensor for monitoring of glycerol during alcoholic fermentation // *Biosensors and Bioelectronics.*— 1998.— Vol. 13.— P. 875 — 880.
26. *Шкотова Л.В., Горюшкіна Т.Б., Солдаткін О.П., Дзядевич С.В., Гайда Г.З., Павлішко Г.М., Гончар М.В.*, Патент України на корисну модель №24186. Подано 12.01.2007. Опубліковано 25.06.2007, Бюл. № 9.
27. *Ghica M. E., Pauliukaite R., Marchand N., Devic E., Brett C.M.A.*, An improved biosensor for acetaldehyde determination using a bienzymatic strategy at poly(neutral red) modified carbon film electrodes // *Anal. Chim. Acta.* — 2007. — Vol. 591. — P. 80 — 86.
28. *Avramescu A., Noguer T., Avramescu M., Marty J-L.*, Screen-printed biosensors for control of wine quality based on lactate and acetaldehyde determination // *Anal. Chim. Acta.* — 2002. — Vol. 458, № 1. — P. 203 — 213.
29. *Antiochia R., Gorton L.*, Development of a carbon nanotube paste electrode osmium polymer-mediated biosensor for determination of glucose in alcoholic beverages // *Biosensors and Bioelectronics.* — 2007. — Vol. 22. — P. 2611 — 2617.
30. *Gonzalo-Ruiz J., Alonso-Lomillo M.A., Munoz F.J.*, Screen-printed biosensors for glucose determination in grape juice // *Biosensors and Bioelectronics.* — 2007. — Vol. 22. — P. 1517 — 1521.
31. *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 // *Journal of Electroanalytical Chemistry.* — 2005. — Vol. 575. — P. 229 — 241.
32. *Florescu M., Brett C.M.A.*, Development and evaluation of electrochemical glucose enzyme biosensors based on carbon film electrodes // *Talanta.* — 2005. — Vol. 65. — P. 306 — 312.
33. *Zhao M., Hibbert D.B., Gooding J.J.*, An oxygen-rich fill-and-flow channel biosensor // *Biosensors and Bioelectronics.* — 2003. — Vol. 18. — P. 827 — 833.
34. *Wu B., Zhang G., Shuang S.*, Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane // *Talanta.* — 2004. — Vol. 64. — P. 546 — 553.
35. *Yang X, Zhou Z., Xiao D, Choi M.M.F.*, A fluorescent glucose biosensor based on immobilized glucose oxidase on bamboo inner shell membrane // *Biosensors and Bioelectronics.* — 2006. — Vol. 21. — P. 1613 — 1620.
36. *Garcia C.A.B., Oliveira-Neto G., Kubota L.T.*, New fructose biosensors utilizing a polypyrrole film and D-fructose 5-dehydrogenase immobilized by different processes // *Anal. Chim. Acta.* — 1998. — Vol. 374. — P. 201 — 208.
37. *Narvaez A., Suarez G., Popescu I.C., Katakis I., Dominguez E.*, Reagentless biosensors based on self-deposited redox polyelectrolyte-oxidoreductases architectures // *Biosensors and Bioelectronics.* — 2000. — Vol. 15. — P. 43–52.
38. *Bassi A. S., Lee E., Zhu J.-X.*, Carbon paste mediated, amperometric, thin film biosensors for fructose monitoring in honey // *Food Research International.* — 1998. — Vol. 31, № 2. — P. 119 — 127.
39. *Katrlík J., Pizzariello A., Mastihuba V., Svorc J., Stred'ansky M., Miertus S.*, Biosensors for L-malate and L-lactate based on solid binding matrix // *Anal. Chim. Acta.* — 1999. — Vol. 379, № 1 — 2. — P. 193 — 200.
40. *Avramescu A., Noguer T., Magearu V., Marty J L.*, Chronoamperometric determination of d-lactate using screen-printed enzyme electrodes // *Anal. Chim. Acta.* — 2001. — Vol. 433, № 1. — P. 81 — 88.
41. *Parra A., Casero E., Vazquez L., Pariente F., Lorenzo*

- E.*, Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces // *Anal. Chim. Acta.* — 2006. — Vol. 555. — P. 308 — 315.
42. *Esti M., Volpe G., Micheli L., Delibato E., Compagnone D., Moscone D., Palleschi G.*, Electrochemical biosensors for monitoring malolactic fermentation in red wine using two strains of *Oenococcus oeni* // *Anal. Chim. Acta.* — 2004. — Vol. 513, № 1. — P. 357 — 364.
 43. *Serra B., Reviejo A.J., Parrado C., Pingarron J.M.*, Graphite-Teflon composite bienzyme electrodes for the determination of L-lactate: Application to food samples // *Biosensors and Bioelectronics.* — 1999. — Vol. 14, № 4 — 6. — P. 505 — 513.
 44. *Mazzei F., Botru F., Favero G.*, Peroxidase based biosensors for the selective determination of D, L-lactic acid and L-malic acid in wines // *Microchemical Journal.* — 2007. — Vol. 87. — P. 81 — 86.
 45. *Смуток О.В.*, Скринінг мікробних продуцентів, очистка та біоаналітичне використання L-лактат:цитохром с-оксидоредуктази *Hansenula polymorpha*: Дис. канд. біол.наук, 03.00.07. — Львів, 2007. — 140 с.
 46. *Bucur B., Mallat E., Gurban A.-M., Gocheva Y., Velasco C., Marty J.-L., Noguer T.*, Strategies to develop malic acid biosensors based on malate quinone oxidoreductase (MQO) // *Biosensors and Bioelectronics.* — 2006. — Vol. 21. — P. 2290 — 2297.
 47. *Mieliauskienė R., Nistor M., Laurinavicius V., Csoregi E.*, Amperometric determination of acetate with a tri-enzyme based sensor // *Sensors and Actuators B.* — 2006. — Vol. 113. — P. 671 — 676.
 48. *Sanz V., Mena M.L., Gonzelez-Cortes A., Yanez-Sedeco P., Pingarron J.M.*, Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes. Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines // *Anal. Chim. Acta.* — 2005. — Vol. 528. — P. 1 — 8.
 49. *Gomes S.A.S.S., Nogueira J.M.F., Rebelo M.J.F.*, An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine // *Biosensors and Bioelectronics.* — 2004. — Vol. 20. — P. 1211 — 1216.
 50. *Boyukbayram A.E., Kiralp S., Toppare L., Yagci Y.*, Preparation of biosensors by immobilization of polyphenol oxidase in conducting copolymers and their use in determination of phenolic compounds in red wine // *Bioelectrochemistry.* — 2006. — Vol. 69. — P. 164 — 171.
 51. *Campanella L., Bonanni A., Finotti E., Tomassetti M.*, Biosensors for determination of total and natural antioxidant capacity of red and white wines: comparison with other spectrophotometric and fluorimetric methods // *Biosensors and Bioelectronics.* — 2004. — Vol. 19. — P. 641 — 651.
 52. *Situmorang M., Hibbert D.B., Gooding J.J., Barnett D.*, A sulfite biosensor fabricated using electrodeposited polytyramine: application to wine analysis // *Analyst.* — 1999. — Vol. 124. — P. 1775 — 1779.
 53. *Abass A.K., Hart J.P., Cowell D.*, Development of an amperometric sulfite biosensor based on sulfite oxidase with cytochrome c, as electron acceptor, and a screen-printed transducer // *Sensors and Actuators B.* — 2000. — Vol. 62. — P. 148 — 153.
 54. *Alkasrawi M., Popescu I.C., Laurinavicius V., Mattiasson B., Csoregi E.*, A redox hydrogel integrated PQQ-glucose dehydrogenase based glucose electrode // *Anal. Commun.* — 1999. — Vol. 36. — P. 395 — 398.
 55. *Шольц Е.П., Пономарёв В.Ф.*, Технология переработки винограда. — М.: Агропромиздат, 1990. — 447 с.
 56. *Нужный В.П.*, Токсикологическая характеристика этилового спирта, алкогольных напитков и содержащихся в них примесей // *Вопр. наркологии.* 1995. — № 3. — С. 65—74.
 57. *Mayer M., Ruzicka J.*, Flow Injection Based Renewable Electrochemical Sensor System // *Analytical Chemistry.* — 1996. — Vol. 68, № 21 — P. 3808 — 3814.
 58. *Razumiene J., Vilkanauskyte A., Gureviciene V., Laurinavicius V., Roznyatovskaya N.V., Ageeva Y.V., Reshetova M.D., Ryabov A.D.*, New bioorganometallic ferrocene derivatives as efficient mediators for glucose and ethanol biosensors based on PQQ-dependent dehydrogenases // *Journal of Organometallic Chemistry.* — 2003. — Vol. 668. — P. 83 — 90.
 59. *Родонуло А.К.*, Биохимия виноделия.- М.: Пищевая промышленность, 1971. — 428 с.
 60. *Laurinavicius V., Kurtinaitiene B., Razumiene J., Ramanavicius A., Gureviciene V., Meskys R., Mieliauskienė R., Lapenaite I.*, Biosensors and Analyzers for the Determination of Metabolites in Biological Samples // *Biomedicine.* — 2001. — Vol. 1, № 1. — P. 27 — 32.
 61. *Laurinavicius V., Razumiene J., Kurtinaitiene B., Lapenaite I., Bachmatova I., Marcinkeviciene L., Meskys R., Ramanavicius A.*, Bioelectrochemical application of some PQQ-dependent enzymes // *Bioelectrochemistry.* — 2002. — Vol. 55. — P. 29 — 32.
 62. *Комарова Н.В., Каменцев Я.С.*, Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза “Капель”.- Санкт-Петербург: Веда, 2006. — 212 с.
 63. *Риборо-Гайон Ж., Пейно Э.*, Виноделие.- М.: Пищевая промышленность, 1971. — 416 с.
 64. *Tothill I.E.*, Biosensors developments and potential applications in the agricultural diagnosis sector // *Computers and Electronics in Agriculture.* — 2001. — Vol. 30. — P. 205 — 218.
 65. *Theavenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S.*, Electrochemical biosensors: recommended defi-

- nitions and classification // *Pure Appl. Chem.* — 1999. — Vol. 71, № 12. — P. 2333 — 2348.
66. *Katrlík J., Svorc J., Stred'ansky M., Miertus S.*, Composite alcohol biosensors based on solid binding matrix // *Biosensors and Bioelectronics.* — 1998. — Vol. 13, № 2. — P. 181 — 191.
67. *Cosnier S., Fologea D., Szunerits S., Marks R.S.*, Poly(dicarbazole-N-hydroxysuccinimide) film: a new polymer for the reagentless grafting of enzymes and redox mediators // *Electrochemistry Communications.* — 2000. — Vol. 2. — P. 827 — 831.
68. *Tkac J., Vostiar I., Gemeiner P., Sturdik E.*, Monitoring of ethanol during fermentation using a microbial biosensor with enhanced selectivity // *Bioelectrochemistry.* — 2002. — Vol. 56. — P. 127 — 129.