

УДК 577.15, 573.6

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЛАКТАТУ У ВИНОМАТЕРІАЛІ АМПЕРОМЕТРИЧНИМ ФЕРМЕНТНИМ БІОСЕНСОРОМ

*Т. Б. Горюшкіна^{1,2}, Л. В. Шкотова¹, Є. А. Слатья³,
О. П. Солдаткін¹, С. В. Дзядевич¹*

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
вул. Заболотного, 150, м. Київ 03143, Україна,

²Київський національний університет імені Тараса Шевченка, м. Київ

³Національний інститут винограду та вина "Магарач", м. Ялта
e-mail: tatiana_goryushkina@yahoo.com

Анотація

ОПТИМІЗАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЛАКТАТУ У ВИНОМАТЕРІАЛІ АМПЕРОМЕТРИЧНИМ ФЕРМЕНТНИМ БІОСЕНСОРОМ

Т. Б. Горюшкіна, Л. В. Шкотова, Є. А. Слатья, О. П. Солдаткін, С. В. Дзядевич

Відпрацьовано методику визначення лактату у вині за допомогою амперометричного біосенсора на основі платинового друкованого електрода SensLab та лактатоксидази, іммобілізованої у полімері полі(3,4-етилендіокситіафен) шляхом електрохімічної полімеризації. Продемонстровано, що платиновий друкований електрод SensLab без ферментної мембрани не дає відгуку на вино, сусло та основні інтерферуючі речовини вина. Досліджено селективність амперометричного біосенсора на основі лактатоксидази та показано, що основні інтерферуючі речовини вина не впливають на його роботу. За допомогою розробленого біосенсора проведено аналіз концентрації лактату у винах різного типу та у суслі. Показано високу кореляцію результатів, отриманих за допомогою лактатного амперометричного біосенсора, із даними традиційного методу кількісного аналізу лактату — вискоєфективної рідинної хроматографії.

Ключові слова: амперометричний біосенсор, лактат, вино, сусло

Abstract

OPTIMIZATION OF METHODS OF LACTATE DETERMINATION IN WINE BY AMPEROMETRIC ENZYME BIOSENSOR

T. B. Goriushkina, L. V. Shkotova, E. A. Slast'ya, A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych

The method of lactate determination in wine by amperometric biosensor based on platinum screen-printed electrode SensLab and lactate oxidase immobilized in polymer PEDT by electrochemical polymerization was optimized. Platinum screen-printed electrode SensLab without enzymatic membrane was demonstrated to show no response to wine, must and main wine interferents. The selectivity of created lactate biosensor was investigated. The main wine interferents were shown to have no effect on the work of created lactate biosensor. Lactate content in several types of wine and must was determined with created biosensor, and the results were compared with those obtained by traditional analytical method such as HPLC. A good correlation between data obtained by the biosensor method and HPLC was shown.

Keywords: amperometric biosensor, lactate, wine, must

Аннотация**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛАКТАТА В ВИНОМАТЕРИАЛЕ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ ФЕРМЕНТНЫМ БИОСЕНСОРОМ***Т. Б. Горюшкина, Л. В. Шкотова, Е. А. Слатья, А. П. Солдаткин, С. В. Дзядевич*

Отработана методика определения лактата в вине с помощью амперометрического биосенсора на основе платинового печатного электрода SensLab и лактатоксидазы, иммобилизированной в полимере поли(3,4-этилендиоксифенил) путем электрохимической полимеризации. Продемонстрировано, что платиновый печатный электрод SensLab без ферментной мембраны не дает отклика на вино, сусли и основные интерферирующие вещества вина. Исследована селективность амперометрического биосенсора на основе лактатоксидазы и показано, что основные интерферирующие вещества вина не влияют на его работу. С помощью разработанного биосенсора проведен анализ концентрации лактата в винах разного типа и в сусле. Показана высокая корреляция результатов, полученных с помощью лактатного амперометрического биосенсора, с данными традиционного метода количественного анализа лактата — высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Ключевые слова: амперометрический биосенсор, лактат, вино, сусло

Вступ

Виноградні вина є багатокомпонентними системами, до складу яких входять органічні кислоти, вуглеводи, спирти та багато інших сполук. Концентрація інгредієнтів вина широко варіюється в залежності від різновиду і сорту винограду, кліматичних, геологічних, агротехнічних та інших умов. За якісним та кількісним вмістом компонентів у винах можна судити про натуральність напоїв і правильність технології їх виробництва [1].

Контроль вмісту органічних кислот є актуальним на всіх етапах виноробства, 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 [2].

Відомості про концентрацію молочної кислоти — лактату — у винному виробництві мають істотне практичне значення. Постійний, одночасний та вибірково моніторинг лактату є необхідним, тому що цей параметр визначає не тільки якість і особливий аромат вина, але також є індикатором бактеріальної активності під час ферментації [3]. Тому достовірна інформація про вміст лактату у суслі на різних стадіях

виробництва вина дозволяє контролювати та регулювати процес бродіння [4]. Крім того, від концентрації лактату залежить стабільність вин при зберіганні [5].

Велике значення для формування органолептичних якостей вина має так зване яблучно-молочнокисле бродіння, що спостерігається під час дозрівання вин. У його результаті відбувається перетворення малату (яблучної кислоти) на лактат, який має більш м'який смак і робить вино більш гармонійним. Дане перетворення особливо важливе для створення високоякісних червоних вин, проте є небажаним у випадку виробництва деяких сухих та напівсухих білих вин [6]. Яблучно-молочнокисле бродіння також позитивно впливає на смак вина при виробництві його із винограду, вирощеного у прохолодних кліматичних зонах, тоді як у регіонах з теплим кліматом, в яких кислотність винограду є нижчою, подібного перетворення краще уникати [7]. Тому яблучно-молочнокисле бродіння у процесі виноробства повинно чітко контролюватися шляхом постійного аналізу вмісту лактату та малату у виноматеріалах.

Для визначення концентрації лактату у вині застосовується низка традиційних методів аналізу: рідинна хроматографія, капілярний електрофорез, спектрофотометричний та ферментативний методи [1]. Основними недоліками традиційних методів визначення лактату

є висока вартість обладнання, яке, крім того, досить важко ввести безпосередньо в технологічний процес, значна трудомісткість та тривалість аналітичної процедури, необхідність попередньої підготовки проби і недостатня селективність та чутливість аналізу.

Альтернативою класичним методам є біосенсор — зручний інструмент для визначення концентрації лактату, який не потребує попередньої підготовки проби, складного устаткування та високої кваліфікації обслуговуючого персоналу. Завдяки використанню специфічних ферментів біосенсор забезпечує високу селективність аналізу, а завдяки застосуванню сучасних досягнень в області мікроелектроніки, — його високу чутливість. Крім того, відгук амперометричних біосенсорів не залежить від буферної ємності та іонної сили розчину, в якому проводиться вимірювання, а це, безперечно, є великою перевагою при проведенні аналізів реальних рідин [2].

Найчастіше для розробки лактатних амперометричних біосенсорів, призначених для аналізів вина, використовуються три ферменти — лактатдегідрогеназа (ЛД) [3, 6, 8, 9], лактатоксидаза (ЛОД) [4, 5, 7, 10, 11] або флавоцитохром b_2 (ФЦ b_2) [12].

Аналіз робочих характеристик біосенсорів, створених із застосуванням різних ферментів, свідчить, що датчики з іммобілізованою ЛОД володіють більшою стабільністю, ширшим лінійним діапазоном та нижчою межею детекції у порівнянні з датчиками на основі ЛД та ФЦ b_2 . Використання у роботі ЛОД дозволяє визначати 4 [11] і навіть 2 мкмоля лактату [5], що є суттєвою перевагою при аналізі вин із незначною концентрацією лактату. При застосуванні у цьому випадку дегідрогеназного біосенсора отримані результати виявляються майже у 2 рази завищеними через недостатню чутливість біосенсора [3]. Іншою перевагою оксидазних біосенсорів є те, що їхня робота не потребує наявності екзогенного кофактора, що значно спрощує процес аналізу [11].

Застосування розроблених лактатних біосенсорів дозволяє швидко і без значних зусиль отримати достовірні дані щодо вмісту лактату у вині, які відповідають результатам класичних методів аналізу — спектрофотометричного [4, 5], ферментативного [12] та хроматографічного [6, 11].

Незважаючи на численні публікації, присвячені створенню біосенсорів для аналізу лактату

у вині, зберігається великий інтерес до розробки і оптимізації лактатних датчиків з метою покращення їхньої стабільності, чутливості та селективності. Не менша увага приділяється і усуненню недоліків лактатних біосенсорів, які заважають їх застосуванню для аналізу реальних рідин.

Суттєвою проблемою, яка постає при здійсненні аналізів безпосередньо у винах та виноматеріалах, є залежність роботи лактатних біосенсорів від інтерферуючих сполук вина — етанолу, фенольних речовин та аскорбінової кислоти [3, 4, 6]. При цьому поява неспецифічного сигналу може бути обумовлена як неселективним відгуком ферментативної мембрани [4], так і реакцією на інтерференти самої поверхні робочого електрода. Наприклад, у роботі [6] було встановлено, що композитний електрод без ферментативної мембрани дає відгук до 50 нА на внесення розведеного у 150 разів червоного вина. Скоріш за все, появу сигналу у даному випадку викликають антоціани, катехіни, флавоноїди та фенольні кислоти, які легко окиснюються і які містяться у червоних винах у значно більших кількостях, ніж у білих. Очевидно, що при використанні лактатних біосенсорів для аналізу реальних рідин їх неселективний відгук повинен бути мінімізований.

Метою даної роботи була оптимізація амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої лактатоксидази та платинового друкованого електрода SensLab для проведення аналізу лактату у винах та виноматеріалах.

Матеріали і методи

Матеріали

У роботі використовували фермент лактатоксидазу з *Pediococcus species* активністю 39 У/мг сухого матеріалу виробництва фірми “Sigma” (Німеччина).

В якості матриці для електрохімічної полімеризації ферменту використовували мономер 3,4-етилендіокситіафен (ЕДТ) виробництва фірми Baytron M (Німеччина) та полі (етиленгліколь) 1450 фірми “Sigma” (Швейцарія).

Також у роботі використовували реагенти $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , пероксид водню виробництва фірми “Фаргомед” (Україна), лактат натрію виробництва фірми “Sigma” (США), глюкозу виробництва фірми “Sigma-Aldrich Chimie

S.a.r.l.” (Франція), етанол виробництва фірми “Fluka” (Німеччина), L-аскорбінову кислоту виробництва фірми “Sigma-Aldrich Chimie S.a.r.l.” (Франція) та гліцерин виробництва України. Усі реактиви, як вітчизняного, так і імпортного виробництва були кваліфікації “ос.ч” і “х.ч”.

Вимірювання

Усі електрохімічні експерименти були виконані за допомогою традиційної триелектродної системи, в якій друкований електрод SensLab (“SensLab GmbH”, Leipzig, Німеччина) об’єднав у собі усі три електроди: платиновий робочий, допоміжний та електрод порівняння.

Платинові друковані електроди SensLab досліджувались на відтворюваність та працездатність у діапазоні потенціалу від 0 до +600 мВ (швидкість розгортання потенціалу 20 мВ/с). Циклічну вольтамперометрію було виконано на потенціостаті PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди). На рис. 1 представлено циклічну вольтамперограму, отриману на промисловому платиновому електроді SensLab у робочому буфері та при додаванні 50 мкМ пероксиду водню. Як видно з рисунку, при додаванні у робочу комірку пероксиду водню спостерігається поява окиснювального струму та підвищення сигналу датчика. У якості компромісу між чутливістю біосенсора та зменшенням впливу на його відгук інтерферуючих часток (які звичайно окиснюються при більш високих потенціалах) потенціал +200 мВ було обрано нами як робочий.

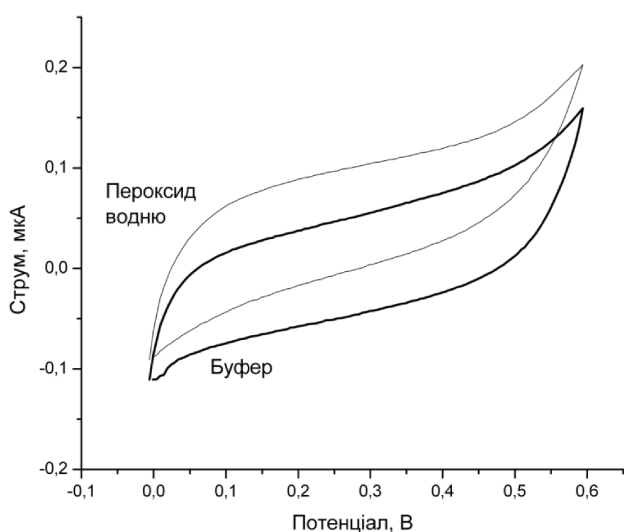


Рис. 1. Циклічна вольтамперограма, отримана на промислових платинових друкованих електродах SensLab у фосфатному буфері та при додаванні 50 мкМ пероксиду водню

Амперометричне вимірювання при постійному потенціалі проводили в електрохімічній комірниці об’ємом 5 мл за допомогою потенціостата PalmSens.

Імобілізація ЛОД шляхом електрохімічної полімеризації у полімері ЕДТ

Процес електрохімічної полімеризації представляє собою особливий інтерес, тому що є технологічно зручним. Він дозволяє обирати та підтримувати розмір, форму та товщину матриці і забезпечує чіткий контроль за процесом осадження [11]. Крім того, отримані із застосуванням даного методу напівпроникні полімерні плівки можуть виступати у якості селективного бар’єру для електрохімічно активних інтерферуючих часток [13].

Полі(3,4-етилendioкситіафен) (ПЕДТ) входить до родини політіофенів — провідних полімерів з відносно новими та досить цікавими властивостями. Виконані з ними дослідження [14] свідчать, що вони демонструють слабку провідність, невелику зміну заряду, підвищену стабільність та дуже хорошу здатність до формування плівки.

Гомогенна плівка ПЕДТ фіксується на поверхні робочого електрода, заполімеризованого електрохімічно ЕДТ, за умов нейтрального рН та температури. Формування плівки відбувається краще у водних та при можливості гідрофільних полімерах типу полівенілпірролідон (ПВП) чи поліетиленгліколь (ПЕГ), розчинених у воді з електрополімеризуючим розчином. При цьому підвищується гідрофільність полімеру, що наноситься. Окиснення та відновлення залежить від потенціалу, що прикладається, який контролює формування позитивного заряду в структурі полімеру. Для ПЕДТ є докази, що поліаніони як олігонуклеотиди можуть бути ефективно утримані у полімерній сітці, що працює при слабкій іонній силі [11].

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

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

Визначення лактату у модельних розчинах

Вимірювання проводили при кімнатній температурі у відкритому об'ємі з інтенсивним перемішуванням. У якості робочого буферу використовувався 20 мМ розчин KH_2PO_4 — Na_2HPO_4 з рН 7,2, оскільки, як було встановлено у наших попередніх дослідженнях [11], саме рН 7,2 є оптимальним для функціонування іммобілізованої у ПЕДТ ЛОД.

Концентрації субстратів змінювали шляхом додавання певних аліквот концентрованих розчинів. Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали буферним розчином до стабілізації базового сигналу.

Визначення лактату у вині та у суслі класичним методом

Аналіз лактату проводили у 12 зразках вин різного типу, вироблених в умовах мікровиноробства в Інституті винограду та вина “Магарач”, а також у 2 зразках білих та червоних виноматеріалів.

Визначення лактату у суслі та у готових винах проводили за допомогою методу високо-ефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) із застосуванням хроматографа фірми Shimadzu (модель LC20 Prominence) та спектрофотометричного детектора. Для проведення аналізу була використана хроматографічна колонка Phenomenex Luna C_{18} (2), розміром 2,1 Ч 150 мм, заповнена сорбентом з привитою октадецильною фазою (подвійний ендкемпінг) зерненням 3,0 мкм. Ідентифікацію піків здійснювали методом додавання стандартних зразків лактату. Масову концентрацію лактату розраховували, виходячи зі значень площ піків за градувальною характеристикою.

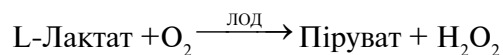
Визначення лактату у вині та у суслі за допомогою амперометричного біосенсора

Вимірювання проводились у 20 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,2 при кімнатній температурі у відкритому об'ємі з інтенсивним перемішуванням.

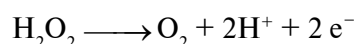
Визначення концентрації лактату у винах та виноматеріалах проводили за допомогою методу стандартних додавань. Для проведення аналізу пробу розводили у 250 разів (у електрохімічну комірку вносили 20 мкл вина). Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали буферним розчином до стабілізації базового сигналу.

Результати та обговорення

Робота амперометричних біосенсорів, розроблених на основі ЛОД, базується на наступній ферментативній реакції:



Процес ферментативного перетворення лактату супроводжується виділенням електрохімічно активної речовини — пероксиду водню, що окиснюється з утворенням електронів, які реєструються амперометричним перетворювачем:



Для іммобілізації ЛОД у роботі використовувався метод електрохімічної полімеризації у полімері ПЕДТ. Калібрувальна крива амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої у ПЕДТ лактатоксидази представлена на рис. 2. Мінімальна концентрація лактату, що визначається розробленим біосенсором, становить 8 мкМ, лінійна залежність величини відгуку сенсора від концентрації лактату спостерігається у діапазоні 0,008 — 1,0 мМ.

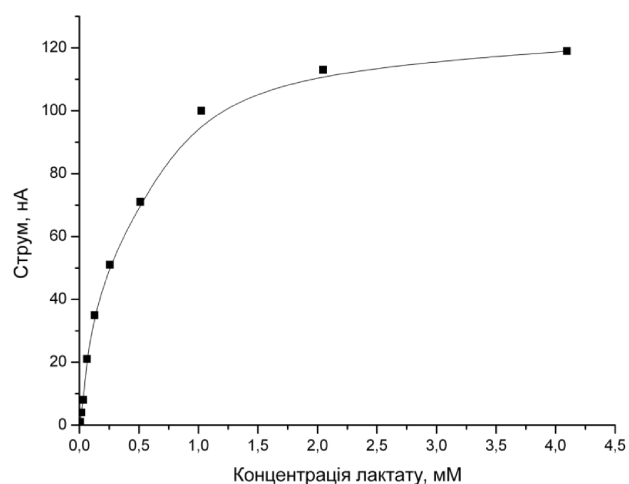


Рис. 2. Калібрувальна крива амперометричного біосенсора на основі платинового друкованого електрода SensLab та іммобілізованої у ПЕДТ лактатоксидази. Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2 при потенціалі +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

На першому етапі роботи було визначено оптимальний ступінь розведення проб вина для їх аналізу за допомогою розробленого амперометричного біосенсора. На рис. 3 представлено відгуки біосенсора на основі іммобілізованої ЛОД на внесення в електрохімічну

комірку 5, 10, 20, 50 та 100 мкл проб трьох типів вин з різним вмістом лактату (розведення у 1000, 500, 250, 100 та 50 разів відповідно). Для аналізу були використані проби вина Аліготе (вміст лактату, згідно даним методу ВЕРХ, 1,98 г/л), Кара-Даг (0,98 г/л лактату) та Мадера (0,49 г/л лактату). З рисунку видно, що при розведенні у 50 та 1000 разів спостерігається більший розкид даних для трьох різних проб вина, а діапазон розведень 100 — 500 є більш придатним для роботи. Тому для подальших експериментів було обрано розведення вина у 250 разів.

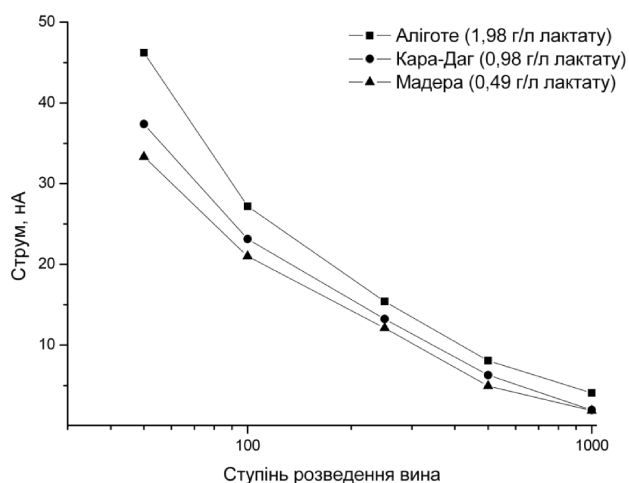


Рис. 3. Відгуки амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої ЛЮД на внесення в електрохімічну комірку 5, 10, 20, 50 та 100 мкл (розведення у 1000, 500, 250, 100 та 50 разів відповідно) проб трьох типів вин з різним вмістом лактату

На наступному етапі було досліджено вплив основних компонентів вина на функціонування як створеного лактатного біосенсора, так і платинового друкованого електрода SensLab без ферментної мембрани.

У ході роботи були отримані відгуки платинового друкованого електрода SensLab без мембрани на внесення в електрохімічну комірку етанолу, гліцерину, глюкози, лактату (усі у концентрації від 0,1 до 80 мМ), аскорбінової кислоти (у концентрації від 0,001 до 0,26 мМ), а також розведених у 250 разів проб вина та сусла. З рис. 4 видно, що платиновий електрод SensLab без ферментної мембрани не реагує на лактат, глюкозу та аскорбінову кислоту і демонструє незначні відгуки лише на великі концентрації етанолу і гліцерину (вище 10 — 20 мМ). При цьому максимально можливий вміст основних інтерферуючих речовин у суслі та вині, розве-

дених у 250 разів, є наступним [1]: етанол — до 14 мМ, гліцерин — до 0,5 мМ, глюкоза — до 3 мМ, аскорбінова кислота — до 0,01 мМ.

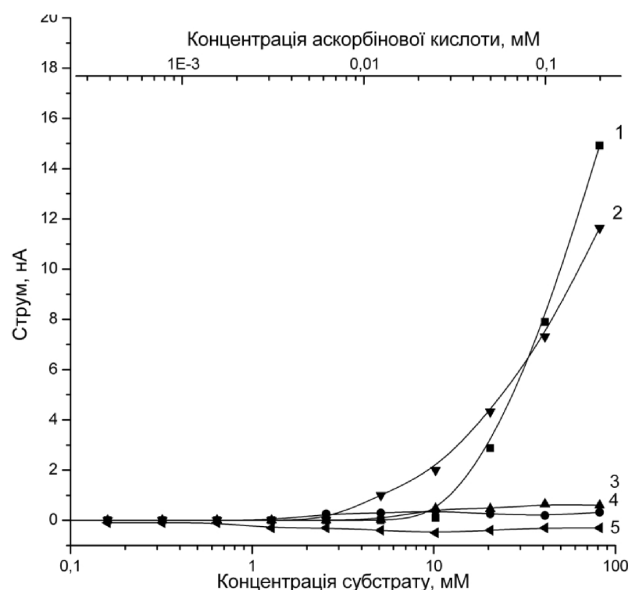


Рис. 4. Відгуки платинового друкованого електрода SensLab (без ферментної мембрани) на внесення у електрохімічну комірку: 1 — етанолу; 2 — гліцерину; 3 — глюкози; 4 — лактату; 5 — аскорбінової кислоти

Найбільший відгук, який давав платиновий електрод SensLab без мембрани на червоне вино, становив 0,6 нА, а на сусло “-0,5 нА” (проби були розведені у 250 разів), що значно менше корисного сигналу, який сягає 100 нА.

Таким чином, отримані результати свідчать, що платиновий друкований електрод SensLab без ферментної мембрани не дає відгуку на вино, сусло та основні інтерферуючі речовини в максимально можливих у вині концентраціях. Тому біосенсор, розроблений із застосуванням даного амперометричного перетворювача, може бути ефективно використаний для проведення аналізів вина та виноматеріалу.

Окрім того, було досліджено селективність амперометричного біосенсора на основі платинового електрода SensLab та іммобілізованої у ПЕДТ ЛЮД. Були отримані калібрувальні криві розробленого датчика по етанолу (в межах концентрацій від 1 до 20 мМ), гліцерину (0,05 — 13 мМ), глюкози (0,5 — 5 мМ) та аскорбінової кислоти (0,001 — 0,13 мМ). Рис. 5 ілюструє, що лактатний амперометричний біосенсор практично не реагує на основні інтерферуючі речовини вина, і його відгук на лактат значно перевищує величину неспецифічних відгуків.

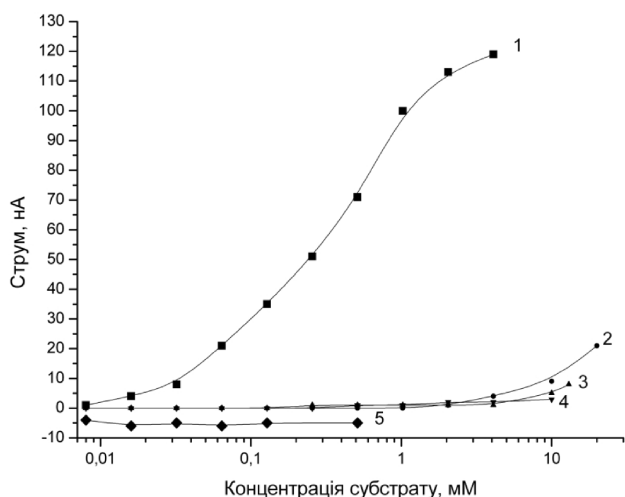


Рис. 5. Калібрувальні криві амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої лактатоксидази по: 1 — лактату; 2 — етанолу; 3 — гліцерину; 4 — глюкози; 5 — аскорбінової кислоти

З метою встановити, чи впливають на роботу створеного датчика інші компоненти вина (наприклад, фенольні сполуки), нами було проведено наступний дослід. До вина Аліготе було додано препарат ЛОД для розщеплення лактату, який містився у пробі. Потім були отримані відгуки лактатного біосенсора на внесення 20 мкл даної суміші, відібраної через певні проміжки часу після змішування проби та ферменту. Як видно з рис. 6, через 6 годин інкубації суміші, коли лактат повністю розщеплено ферментом, біосенсор не реагує на внесення проби вина в електрохімічну комірку. Даний експеримент свідчить, що нами було розроблено дійсно високоспецифічний та селективний біосенсор для аналізу лактату у вині.

Після дослідження чутливості та селективності лактатного амперометричного біосенсора стало можливим проведення за його допомогою аналізу лактату у реальних зразках. Для визначення концентрації лактату у винах амперометричним біосенсором використовували метод стандартних додавань. Для цього спочатку отримували відгук біосенсора на внесення в електрохімічну комірку проби вина, що аналізується. Потім до еквівалентного об'єму вина додавали стандартний розчин з відомою концентрацією лактату та реєстрували сигнал датчика на внесення даної суміші. Після здійснення серії послідовних аналізів (з використанням стандартних розчинів з різною концентрацією лактату) отримували набір точок — пряму лінію, яка після екстраполяції на вісь абсцис

відсікала на ній значення концентрації лактату у пробі вина, що аналізується. З рис. 7 видно, що вміст лактату в комірці при внесенні розведеної проби вина Мадера складав 0,0190 мМ, Кара-Даг — 0,0350 мМ, Аліготе — 0,0787 мМ, і це означає, що у даних винах концентрація лактату є 0,532 г/л для Мадери, 0,98 г/л для Кара-Дагу та 2,204 г/л для Аліготе.

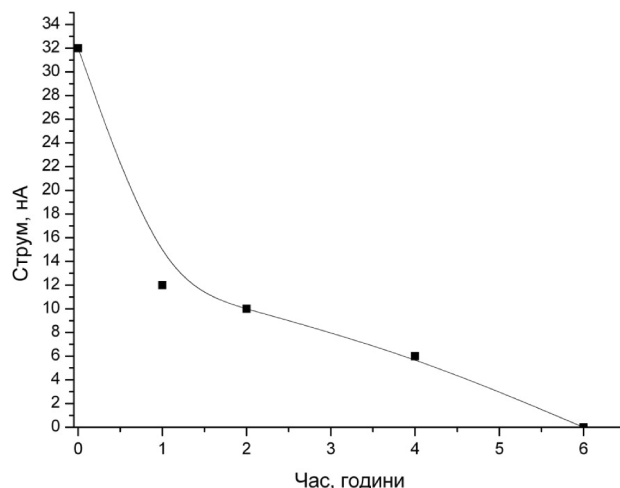


Рис. 6. Зміна величини відгуку амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої лактатоксидази на внесення 20 мкл суміші Аліготе+ЛОД у залежності від часу інкубації суміші

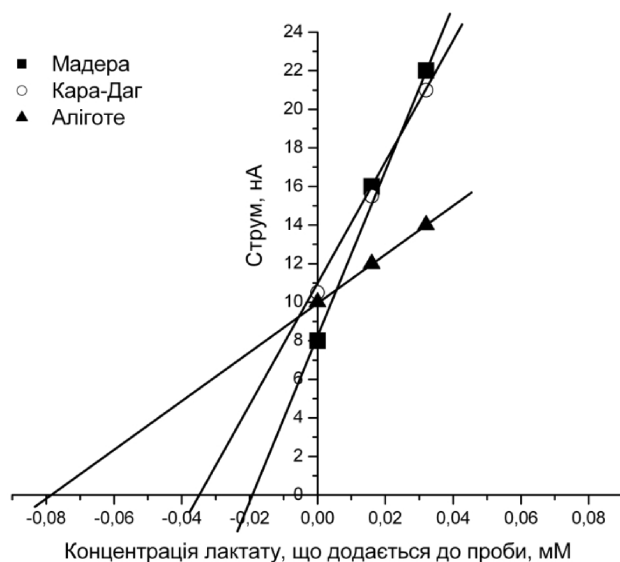


Рис. 7. Визначення концентрації лактату у зразках вина Аліготе, Кара-Даг та Мадера за допомогою методу стандартних додавань

Наступним етапом роботи було порівняння результатів аналізу лактату у вині, отриманих за допомогою біосенсора, із даними традиційного методу аналізу. В якості об'єкта дослідження

були використані 12 проб вина різного типу та 2 проби білих та червоних виноматеріалів.

Визначення вмісту лактату у вині та у суслі проводилось із використанням двох методів: за допомогою розробленого нами амперометричного біосенсора з іммобілізованою лактатоксидазою та методом високоефективної рідинної хроматографії. Отримані дані пред-

ставлені у Таблиці 1. Слід відмітити високу кореляцію між результатами, одержаними із використанням амперометричного біосенсора та класичного хроматографічного методу аналізу лактату. При цьому ще раз наголосимо, що у випадку застосування біосенсора аналітична процедура є менш тривалою, трудомісткою та витратною.

Таблиця 1

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

Проба	Тип	Концентрація лактату, г/л	
		Біосенсор	ВЕРХ
Ркацителі “Коктебель”	Біле, столове, сухе	1,62±0,005	1,62
Аліготе “Коктебель”	Біле, столове, сухе	2,2±0,15	1,98
Мерло “Коблево”	Червоне, столове, сухе	1,21±0,02	1,27
Каберне “Коктебель”	Червоне, столове, сухе	1,04±0,009	1,08
Монте Блан “Коктебель”	Біле, столове, напівсолодке	1,01±0,015	1,07
Портвейн 777 червоний	Червоне, міцне	0,80±0,02	0,81
Портвейн 777 рожевий	Рожеве, міцне	0,63±0,05	0,64
Портвейн білий	Біле, міцне	0,76±0,02	0,69
Мадера “Масандра”	Біле, міцне	0,53±0,01	0,49
Кокур “Коктебель”	Біле, десертне	0,58±0,01	0,53
Кара-Даг “Коктебель”	Червоне, десертне	0,98±0,01	0,98
Кагор Український	Червоне, десертне	0,95±0,04	0,89
Сусло біле	-	0	0
Сусло червоне	-	0	0

Нарешті, було досліджено операційну стабільність створеного лактатного біосенсора та показано, що через 3 години роботи біосенсор втрачає 71% від початкового сигналу, а протягом наступних 5 годин його активність залишається незмінною (рис. 8).

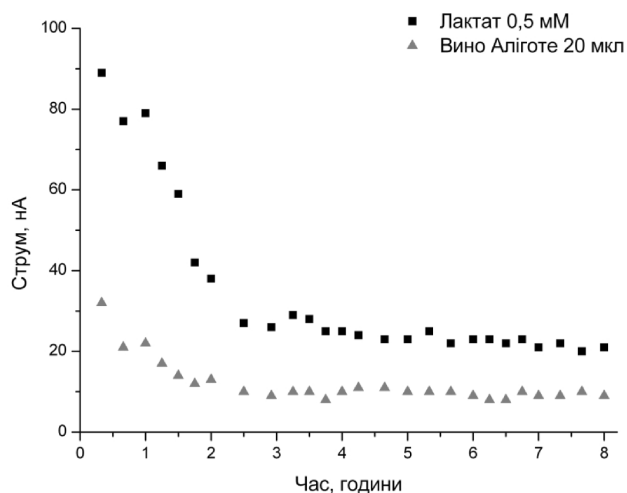


Рис. 8. Операційна стабільність амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої лактатоксидази

Таким чином, у ході роботи було відпрацьовано методику визначення лактату у вині за допомогою амперометричного біосенсора на основі платинового друкованого електрода SensLab та іммобілізованої у полімері ПЕДТ лактатоксидази. Було продемонстровано, що платиновий друкований електрод SensLab без ферментної мембрани не дає відгуку на вино, сусло та основні інтерферуючі речовини в максимально можливих у вині концентраціях. Було досліджено селективність амперометричного біосенсора на основі лактатоксидази та показано, що основні інтерферуючі речовини вина не впливають на його роботу. Вивчено операційну стабільність створеного датчика та його стабільність при зберіганні. За допомогою розробленого біосенсора проведено аналіз концентрації лактату у винах різного типу та у суслі. Показано високу кореляцію результатів, отриманих за допомогою лактатного амперометричного біосенсора, із даними традиційного методу аналізу лактату — високоефективної рідинної хроматографії.

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України в рамках комплексної науко-

во-технічної програми “Сенсорні системи для медико-екологічних та промислово-технічних потреб” та проекту УНТЦ 4378.

Література:

1. Горюшкіна Т.Б., Дзядевич С.В., Виноградні вина: хімічний склад та традиційні методи визначення їхніх компонентів // Біотехнологія. — 2008. — № 2. — в друці.
2. Горюшкіна Т.Б., Дзядевич С.В., Ферментні біосенсори для кількісного аналізу компонентів вина // СЕМСТ. — 2008.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. Katrlík J., Pizzariello A., Mastihuba V., Svorec 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.
7. Mazzei F., Botre 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.
8. Miertus S., Katrlík J., Pizzariello A., Stred'ansky M., Svitel J., Svorec J., Amperometric biosensors based on solid binding matrices applied in food quality monitoring // Biosensors and Bioelectronics. — 1998. — Vol. 13, № 7 — 8. — P. 911 — 923.
9. 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.
10. 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.
11. Шкотова Л.В., Горюшкіна Т.Б., Сластья 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.
12. 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.
13. Azevedo A.M., Prazeres M.F., Cabral J.M.S., Fonseca L.P., Ethanol biosensors based on alcohol oxidase // Biosensors and Bioelectronics. — 2005. — Vol. 21. — P. 235 — 247.
14. Ghosh S., Rasmusson J., Inganas O., Supramolecular self-assembly for enhanced conductivity in conjugated polymer blends: ionic crosslinking in blends of Poly (3,4-ethylenedioxythiophene)-Poly (styrenesulfonate) and Poly (vinylpyrrolidone) // Adv. Mater.— 1998.— Vol.10, №14.— P. 1097 — 1099.