



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **45283** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 21/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ L-ЛАКТАТУ У ПРОДУКТАХ ХАРЧУВАННЯ ТА БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

1

(21) u200808924

(22) 08.07.2008

(24) 10.11.2009

(46) 10.11.2009, Бюл.№ 21, 2009 р.

(72) ГОНЧАР МИХАЙЛО ВАСИЛЬОВИЧ, СМУТОК
ОЛЕГ ВОЛОДИМИРОВИЧ, ОСЬМАК ГАЛИНА
СТЕПАНІВНА

(73) ІНСТИТУТ БІОЛОГІЇ КЛІТИНИ НАН УКРАЇНИ

(57) 1. Спосіб кількісного визначення вмісту L-лактату у продуктах харчування та біологічних рідинах шляхом ферментативного перетворення L-лактату до пірвату і спектрофотометричного

2

моніторингу реакції, який **відрізняється** тим, що як фермент використовують високоселективну термостабільну L-лактат:ферицитохром c-оксидоредуктазу (флавоцитохром b₂) метилотрофних дріжджів *Hansenula polymorpha*.

2. Спосіб кількісного визначення вмісту L-лактату за п. 1, який **відрізняється** тим, що для спектрофотометричного моніторингу реакції використовують фериціанід калію, який в присутності L-лактату, солей заліза (III) і солюбілізатора перетворюється в розчинну форму Берлінської блакиті, придатної для фотометрування.

Корисна модель відноситься до харчової галузі та може використовуватись у медицині.

Лактат - молочна кислота є універсальним метаболітом майже усіх живих організмів і природним компонентом багатьох харчових продуктів, зокрема молочних та вин, а також харчовим консервантом. Моніторинг лактату є необхідним у виноробстві, пивоварінні [Avramescu A., Andreescu S., Noguer T., Bala C., Andreescu D., Marty J. L., Biosensors designed for environmental and food quality control based on screen-printed graphite electrodes with different configurations // Anal. Bioanal. Chem. - 2002. - 374,(1). - P.25-32]. Вміст лактату у винах служить важливою характеристикою вин вищої якості (марочних вин), оскільки в процесі дозрівання вин яблучна кислота з різкуватим кислим присмаком перетворюється в більш м'яку - молочну, суттєво поліпшуючи органолептичні характеристики вина. Аналіз лактату широко використовують у молочній галузі харчової промисловості [Symons H. Nutritional value of yogurt and fermented milks // Danone. World. Newsletter - 1993. - N2.], а також для контролю якості продуктів, які містять солі лактату або саму молочну кислоту як pH-стабілізуючу та консервуючу добавку (зокрема, як добавок до м'ясних продуктів для пригнічення росту патогенних бактерій *Listeria monocytogenes*) [Ricke S. C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials // Poult. Sci. - 2003. - 82, (4). - P.632-639., Ross R. P., Morgan S., Hill C Preservation and fermentation: past,

present and future // J. Food. Microbiol. - 2002. - 79, (1-2). - P.3-16]. Багато косметичних, фармацевтичних препаратів, миючих та дезінфікуючих засобів також містять лактат, вміст якого слід контролювати [Ademola J., Frazier C, Kim S. J., Theaux C, Saudez X., Clinical evaluation of 40% urea and 12% ammonium lactate in the treatment of xerosis. // Am. J. Clin. Dermatol. - 2002. - 3, (3). - P.217-222, Hubinger J. C. A survey of consumer cosmetic products and salon preparations for alpha hydroxy acids // J. Cosmet. Sci. - 2002. - 53, (5). - P.243-248].

Молочна кислота може існувати у формі двох (L- і D-) стереоізомерів і саме L-ізомер є основним метаболітом у природі.

Рівень молочної кислоти в крові служить важливим клініко-діагностичним індикатором гіпоксії, ацидозу [Artiss J. D., Karcher R. E., Cavanagh K. T., Collins S. L., Peterson V. J., Varma S., Zak B. A liquid-stable reagent for lactic acid levels. Application to the Hitachi 911 and Beckman CX7 // Am. J. Clin. Pathol. - 2000. - 114, (1). - P.139-143, Frommer J. P. Lactic acidosis // Med. Clin. North. Am. - 1983. - 67, (4). - P.815-829], рівня токсичності ліків [Kost G. J., Nguyen T. H., Tang Z. Whole-blood glucose and lactate. Trilayer biosensors, drug interference, metabolism, and practice guidelines // Arch. Pathol. Lab. Med. - 2000. - 124, (8). - P.1128-1134]. Тестування цього метаболіту в крові спортсменів використовують для моніторингу фізичного навантаження з метою забезпечення оптимальних тренувальних режимів [Jones A. M., Carter H. The effect of endur-

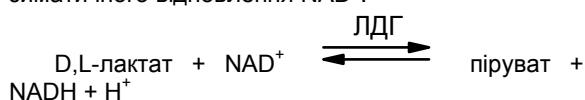
UA (19) **45283** (11) **U** (13)

ance training on parameters of aerobic fitness // Sports. Med. - 2000. - 29, (6). - P.373-386].

При аналізі вмісту лактату основна увага звертається на L-форму, оскільки саме вона є природним метаболітом, а також тому, що більшість доступних ферментів, що використовуються в ензиматичному аналізі лактату, "розпізнають" саме L-стереоізомер. Для аналізу лактату широко використовують фізико-хімічні та хімічні методи [Герасимов І. Г., Плаксіна О. М. Неферментативне визначення лактату та пірувату в одній пробі крові // Лабораторна діагностика. - 2000. - 2. - С.46-47., Павлішко Г. М., Майдан М. М., Гончар М. В., Сибірний А. А. Новий оксидазний метод визначення лактату // Укр. біохім. журн. - 2002. - Т. 74, №2. - С.134-139]. Більшість із хімічних методів аналізу лактату не є селективними і потребують значних затрат часу і підготовчих лабораторних процедур (зокрема, включають фільтрацію, хроматографію, депротейнізацію зразків, кип'ятіння і т.п.).

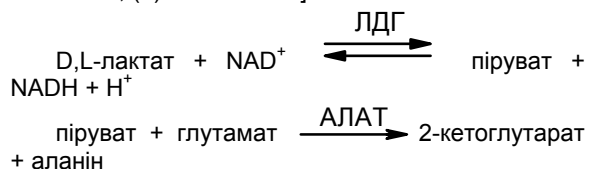
Ферментативні методи аналізу лактату найчастіше базуються на використанні NAD^+ -залежної лактатдегідрогенази (ЛДГ) із м'язів чи серця ссавців (КФ 1.1.1.27) або бактерійної лактат оксидази (ЛО) із *Pediococcus* sp. Спільним недоліком обох підходів є недостатня селективність до L- та D-ізомерів лактату. Хоча, нещодавно, деякі фірми (Sigma-Aldrich) почали випускати L- та D-селективну NAD^+ -залежну ЛДГ, проте її використання в біоаналітиці ще не набуло широкого використання. Наразі, описано методи з використанням лише ЛДГ, здатної окислювати L- та D- форми лактату.

Спектрофотометричне визначення лактату з використанням ЛДГ базується на принципі зміни оптичної густини реакційної суміші внаслідок ензиматичного відновлення NAD^+ :



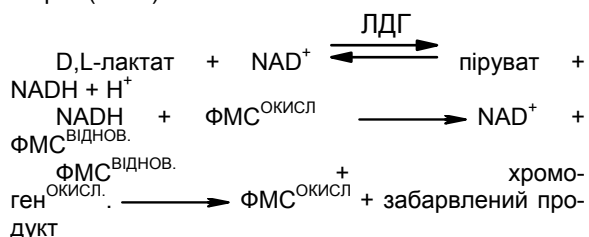
Детекцію проводять в ультрафіолетовому спектрі при довжині хвилі 340нм і обрахунок ведеться із врахуванням коефіцієнту молярної екстинкції $\text{NADH } 6,22\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Проте, описана реакція є оборотною і константа рівноваги зміщена в бік утворення лактату. Для зміщення рівноваги в бік окислення лактату використовують різні підходи: високе значення рН та підвищену концентрацію NAD^+ [Maughan R. J. A simple, rapid method for the determination of glucose, lactate, pyruvate, alanine, 3-hydroxybutyrate and acetoacetate on a single 20- μ l blood sample // Clin. Chim. Acta. - 1982. - 122, - P.231-240], допоміжні реагенти - гідразин або гідроксиламін, які, реагуючи із кетокислотами, запобігають перебігу зворотної реакції [Sundaram P. V., Hinsch W. Single- and coupled-enzyme nylon tube reactors for routine determination of pyruvate and lactate in serum // Clin. Chem. - 1979. - 25, (2). - P.285-288., Cuthbert C, Alberti K. G. Combined enzymatic assays for 3-hydroxybutyrate and lactate: end-point and kinetic methods // Clin. Chim. Acta. - 1978. - 90, (2). P.179-186]. Крім того, запропоновано введення в реакційну суміш додаткових ферментів - глутамат-піруваттрансaminaзи або аланін-

амінотрансферази (АЛАТ) [Noll F. Methode zur quantitativen Bestimmung von L(+)-Lactate mittels Lactat-Dehydrogenase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase // Biochem. Z. - 1966. - 346. - P.41-49., Sundaram P. V., Hinsch W. Single- and coupled-enzyme nylon tube reactors for routine determination of pyruvate and lactate in serum // Clin. Chem. - 1979. - 25, (2). - P.285-288]:



На основі наведеної вище схеми розроблено низку серійних аналітичних наборів для визначення лактату (Sigma, Roche, Enzytec™, Boehringer Mannheim, Megazyme та ін).

Колориметричне визначення лактату базується на утворенні кольорового продукту внаслідок відновлення певного хромогену. Для каталізу цієї реакції використовують низькомолекулярний медіатор електронного перенесення - феназинметосульфат (ФМС):



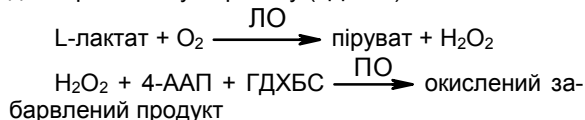
Як хромоген запропоновано використовувати нітротетразолій хлорид (НТЗХ) в лужному буфері із додаванням 2-аміно-2-метил-1,3-пропанодіолу (АМПД) для зв'язування пірувату. Вимірювання оптичної густини реакційної суміші проводили при 540нм [Kikuchi H., Sato T. Colorimetric microdetermination of 1-lactate in deproteinized blood // Tohoku J. Exp. Med. - 1994. - 173, (4). - P.391-397., MacQueen J., Plaut D. Colorimetric microdetermination of plasma lactate // Am. J. Med. Technol. - 1979. - 45, (1). - P.34-37.]. Описано метод детекції лактату із використанням як хромогену п-йодонітротетразолієвого фіолетового (НТЗФ) за утворенням формазану при 540нм [Buttery J. E., Pannall P. R. Colorimetric measurement of D(-)lactate in plasma // Clin Biochem. - 1987. - 20, (4). - P.237-239].

Усі описані методи на основі NAD^+ -залежної ЛДГ мають низку недоліків: неабсолютна селективність, необхідність використання екзогенного кофактору та додаткових піруват-зв'язуючих реагентів (наприклад, гідразину або АМПД) чи ферментів (АЛАТ), що додатково підвищує вартість методів та ускладнює процедуру аналізу.

Визначення молочної кислоти з використанням бактерійної лактатоксидази (ЛО) із *Pediococcus* sp.

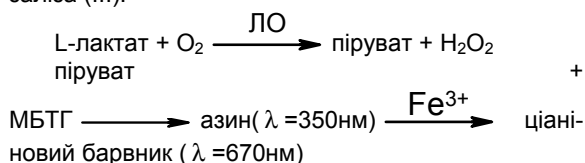
Колориметричне визначення лактату базується на пероксидазному окисленні певних хромогенних систем, що призводить до зміни оптичної густини реакційної суміші. Пероксид водню є побічним продуктом оксидазної реакції. Внаслідок

ензиматичної реакції пероксидази (ПО) із H_2O_2 відбувається одночасне окислення хромогену, що зумовлює перебіг кольорової реакції. Відома хромогенна система на основі суміші 4-аміноантипірину (4-ААП) та 2-гідроксил-3,5-дихлорбензолсульфонату (ГДХБС):



Вимірювання оптичної густини реакційної суміші проводять при 510нм [Bozimowski D., Artiss J. D., Zak B. Sensitive determination of cerebrospinal fluid pyruvate, lactate and glucose concentrations // Clin. Chim. Acta. - 1985. - 153. - P.63-69]. Іншим відомим хромогеном для аналогічної ферментативної системи є 2,2'-азино-біс-[3-етилбензтіазолін сульфонат-6] (АБТС). Максимальне світлопоглинання відповідного барвника спостерігається при 405нм [Lin C. Y., Chen S. H., Kou G. H., Kuo C. M. An enzymatic microassay for lactate concentration in blood and hemolymph // Acta Zoologica Taiwanica - 1999. - 10, (2). - P. 91-101].

Розроблено також ензиматично-хімічний метод визначення лактату на основі ЛО. У цьому методі пероксидазну реакцію, внаслідок якої утворюється кольоровий продукт, замінено на хімічну взаємодію пірувату - продукту лактатоксидазної реакції із 3-метил-2-бензотіазолінонгідразоном (МБТГ) за присутності в реакційному розчині йонів заліза (III):



Розроблений метод має низку переваг у порівнянні із методами з використанням пероксидазної реакції - це висока порогова чутливість та економічність [Павлішко Г. М., Майдан М. М., Гончар М. В., Сибірний А. А. Новий оксидазний метод визначення лактату // Укр. біохім. журн. - 2002. - Т. 74, №2. - С.134-139].

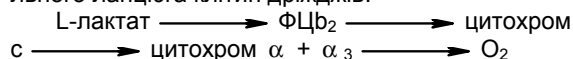
Недоліками використання лактатоксидазних методів визначення лактату є їх дороговизна, тривалий час проведення аналізу та інтерферуєчий вплив білків при високому їх вмісті у досліджуваних зразках (крові) [Bozimowski D., Artiss J. D., Zak B. Sensitive determination of cerebrospinal fluid pyruvate, lactate and glucose concentrations // Clin. Chim. Acta. - 1985. - 153. - P.63-69].

Найбільш близьким аналогом до запропонованої корисної моделі (прототипом) є спосіб визначення L-лактату за допомогою NAD^+ -залежності лактатдегідрогенази (ЛДГ) м'язів та гідразину як піруватзв'язуючого агента для зміщення рівноваги реакції в сторону окислення лактату [Passormeau Janet V., Lowry Oliver H. Enzymatic Analysis: A Practical Guide, Springer, 1993, 194 p.].

Спільними рисами найближчого аналога та корисної моделі є те, що обидва способи базуються на використанні ферментативної реакції, окрім того, спільним є інструментальний спосіб детекції продукту реакції - спектрофотометрія.

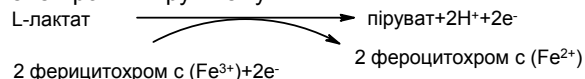
Недоліком прототипу є недостатня селективність і низька чутливість методу та необхідність у використанні додаткового кофактору та високотоксичного реагенту для зміщення рівноваги реакції в бажаному напрямі.

Метою запропонованої корисної моделі було покращення селективності, а значить, точності визначення L-лактату, підвищення чутливості способу, усунення необхідності використання дорогого екзогенного кофактору (NAD^+) та токсичного реагента для зміщення реакції в бік окислення лактату. Поставлена мета досягається шляхом використання в якості ферменту L-лактат:ферицитохром с-оксидоредуктази (КФ 1.1.2.3; флавоцитохром b_2 , ФЦ b_2), яка каталізує необоротне окислення L-лактату до пірувату. Цей фермент є високоселективним до L-лактату і є термостабільним білком, оскільки походить із клітин термотолерантних метилотрофних дріжджів *H. polymorpha* ФЦ b_2 функціонує в клітинах дріжджів як компонент електронтранспортної системи, поєднуючи функції двох різних ферментів - L-лактатдегідрогенази і цитохрому b . ФЦ b_2 є невід'ємним компонентом дихального ланцюга клітин дріжджів:



Особливістю ферменту є його абсолютна специфічність до стереоконфігурації субстрату як

У клітинах дріжджів мітохондріальний ФЦ b_2 каталізує дегідрогенізацію L-лактату до пірувату, переносючи електрони з L-лактату через флавінмононуклеотид (FMN) на проміжний акцептор електронів - групу гему фермента. Кінцевим акцептором електронів *in vivo* є цитохром с. Прямого перенесення електронів від відновленої групи FMNH_2 інтактного ферменту до цитохрому с не виявлено, що підтверджує проміжну акумуляцію електронів в групі гему:



Оптимум рН активності для флавоцитохрому b_2 для лактату і фериціаніду становить 7,0-8,5.

Фермент, отриманий із дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* та *Hansenula anomala*, гомотетрамер, кожна субодиниця якого містить по одній молекулі флавінмононуклеотиду і протогему IX. Флавоцитохром b_2 , завдяки своїм унікальним каталітичним властивостям (абсолютна специфічність до L-лактату, відсутність у потребі екзогенного кофактора) може мати важливе біоаналітичне значення, оскільки може замінити NAD^+ -залежну лактатдегідрогеназу (ЛДГ) або бактерійну лактатоксидазу (ЛО) при визначенні вмісту L-лактату в біологічних рідинах та харчових продуктах за допомогою ензиматичних та біосенсорних підходів. Широке використання ФЦ b_2 із *S. cerevisiae* у біоаналітиці гальмується високою лабільністю фермента та складністю процедури його виділення. З огляду на це, використання стабільної форми ФЦ b_2 із термостабільних дріжджів *H. polymorpha* є дуже актуальним [Смуток О. В., Осьмак Г. С., Гайда Г. З., Гончар М. В. Скринінг дрожжей - продуктової стабільної форми L-лактат-цитохром с

оксидоредуктазы и исследование регуляции ее синтеза // Микробиология. - 2006. - Т. 75, №1. - С.29-34].

Ще одною особливістю пропонованого аналітичного ферментного методу є і те, що в ролі хромогенної системи використано дешеві і не токсичні реагенти, що дозволяє здешевити вартість методу та забезпечує простоту проведення аналізу.

Суть пропонованої конструкції пояснюється за допомогою графічних матеріалів.

На Фіг.1 наведено схему перебігу реакцій пропонованого ферментативного методу.

На Фіг.2 показано максимум піку адсорбції кольорового продукту реакції.

На Фіг.3 представлено калібрувальний графік для визначення L-лактату та діапазон лінійності розробленого лінійності розробленого способу ферментативного визначення L-лактату.

Виготовлення аналітичного набору та хід аналізу для ферментативного визначення вмісту L-лактату в продуктах харчування та біологічних рідинах з використанням флавоцитохрому b_2 метилотрофних дріжджів *H. polymorpha*.

Фермент ФЦ b_2 отримано із клітин термотолерантних метилотрофних дріжджів *Halsenua polymorpha* (дикий штам 356 (leu2) лінії DL1) [Смук О. В., Гайда Г. З., Шуман В., Гончар М. В. Розробка L-лактат - селективного біосенсора на основі термостабільної L-лактат - цитохром с-оксидоредуктази дріжджів // У книзі: „Дослідження у галузі сенсорних систем та технологій” (за ред. акад. Г. В. Єльської, акад. В. Д. Походенка). - К.: Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, 2006. - С.51-57]. Ліофільно висушені клітини дріжджів фізично руйнували скляними кульками Болотіні, з наступним лізисом (12% бутанолом у буфері А, рН 7,5 з додаванням 0,025М ЕДТА та 1мМ ФМСФ). Безклітинні екстракти відокремлювали та визначали білок за Лоурі і активність ФЦ b_2 . Безклітинні екстракти (з сумарною активністю 383 од.) наносили на колонку, заповнену сорбентом DEAE-Toyopearl 650M (TSK-GEL, Японія).

Ступінь очищення цільового фермента від баластних білків характеризували, визначаючи його активність та концентрацію білка в кожній фракції елюату та за допомогою електрофорезу в ПААГ за денатуруючих умов у присутності SDS. Фракції елюату рожевого забарвлення з активністю ФЦ b_2 не менш як 50д./мл об'єднували. Вихід ферменту після стадії хроматографічної очистки близький 90%.

Найвища питома активність в окремих фракціях досягала 120д./мг зі ступенем очистки 32 рази. До об'єднаних фракцій елюату додавали сухий сульфат амонію - до 70% від насичення при 0°C, підтримуючи рН близько 7,5. Безпосередньо перед використанням осад збирали центрифугуванням. Питома активність ферменту після висолювання зростала ще в 1,5 рази і складала 180д./мг білка. Стабілізований таким чином фермент не втрачав своєї активності протягом 6 місяців зберігання при -25°C.

Реакційна суміш для проведення колориметричного аналізу складається з 25мМ фосфатного

буфера, рН 7,7, та з наступних інгредієнтів з кінцевою концентрацією:

- 3мМ фериціанід калію ($K_3Fe(CN)_6$);
- 20мМ хлорид заліза (III) в 30мМ HCl;
- 0,5М щавлева кислота;
- 0,023од./мл. активності ФЦ b_2 .

Таке співвідношення компонентів було отримано експериментально для забезпечення найкращих біоаналітичних характеристик розробленого методу: максимальної чутливості, широкого діапазону лінійності та стабільності отриманого кольорового забарвлення.

Хід аналізу запропонованим методом включав наступні стадії:

Для аналізу відбирали 0,68мл 25мМ фосфатного буфера, рН 7,7; 0,1мл 30мМ $K_3Fe(CN)_6$ та 0,02мл ФЦ b_2 (з об'ємною активністю 1,1од./мл). Запускали реакцію додаванням 0,2мл досліджуваного зразка. Реакцію проводили в затемненому місці протягом 30хв при температурі 25°C. Ферментативну реакцію зупиняли додаванням реагенту - 0,3мл 200мМ $FeCl_3$ в 30мМ HCl, який водночас приводить до утворення кінцевого кольорового продукту - Берлінської блакиті. Для його солюбілізації вносили 1,7мл 0,9 М щавлевої кислоти. Вимірювання оптичної густини реакційної суміші проводили на спектрофотометрі СФ-46 в кюветі на 3мл (оптичний шлях 1см), при 525нм проти "сліпої" проби (додавались усі компоненти, крім дослідного зразка і 0,2мл дистильованої води). Концентрацію L-лактату у реальних зразках визначали за калібрувальною кривою, побудованою на основі модельних водних розчинів L-лактату. Слід зазначити, що оптична густина реакційної суміші після внесення HCl залишалась стабільною протягом 30-40 хвилин.

Пропонований аналітичний ферментативний метод визначення вмісту L-лактату у продуктах харчування та біологічних рідинах працює таким чином.

Ензиматичне окислення L-лактату поєднане із неензиматичною реакцією між фероціанідом $Fe(CN)_6^{4-}$, генерованим внаслідок ензиматичної реакції, та іонами заліза (III). Внаслідок цих взаємодій утворюється інтенсивно забарвлений продукт - Берлінська блакить (Фіг.1). Цей принцип був вперше застосований нами для розробки дуже чутливого методу візуалізації ферментативної активності ФЦ b_2 після проведення нативного електрофорезу [Гайда Г. З., Стельмащук С. Я., Смук О. В., Гончар М. В. Новый метод обнаружения ферментативной активности флавоцитохрома b_2 на электрофореграммах // Прикл. биохим. и микробиол. - 2003. - Т. 39, №2. - С.249-252.]. Через надзвичайно низьку розчинність Берлінської блакиті у водному розчині її використання в колориметричному аналізі є практично нереальним, і тільки завдяки специфічному солюбілізатору, який забезпечує переведення Берлінської блакиті в розчинну форму, такий аналіз став можливим.

Визначення величини хвилі для забезпечення максимуму поглинання реакційної суміші проведено на спектрофотометрі SHIMADZU UV-1650 PC у видимому діапазоні з використанням стандартного програмного забезпечення "UVProbe 2.20" показа-

ло, що максимум абсорбції реакційної суміші припадає на довжину хвилі 680нм (Fig.2). Саме при такій величині хвилі найкраще проводити визначення лактату пропонуванням нами методом.

Оптимізовані умови проведення визначення L-лактату забезпечують лінійність методу в діапазоні 0,004-0,27мМ L-лактату. Чутливість методу є близькою 3,3 μ М L-лактату (Фіг.3).

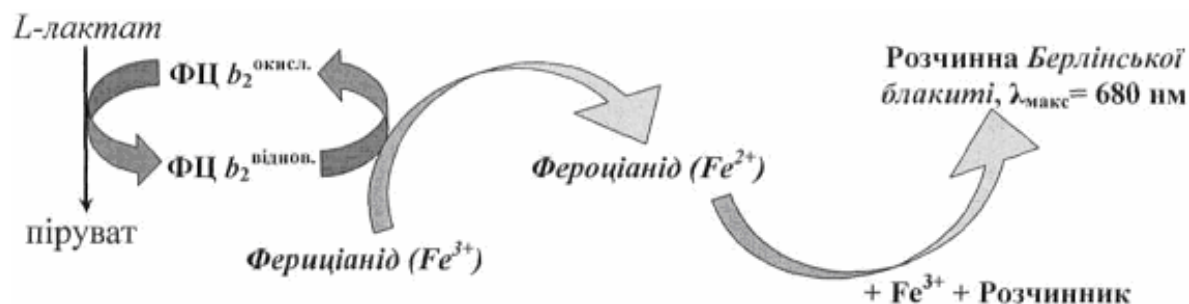


Fig. 1

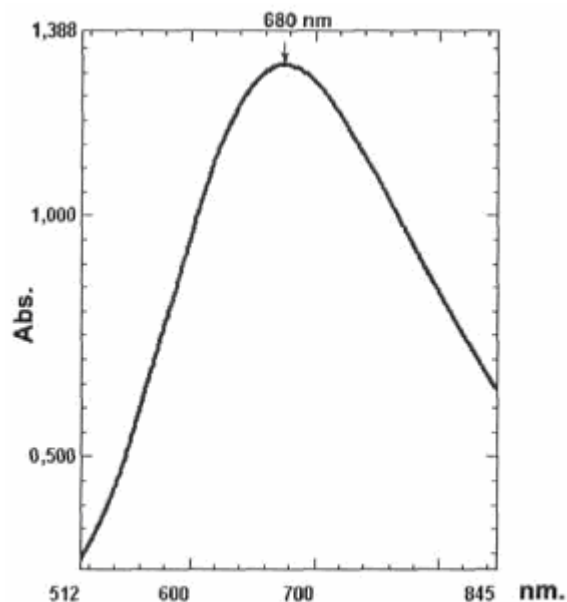


Fig. 2

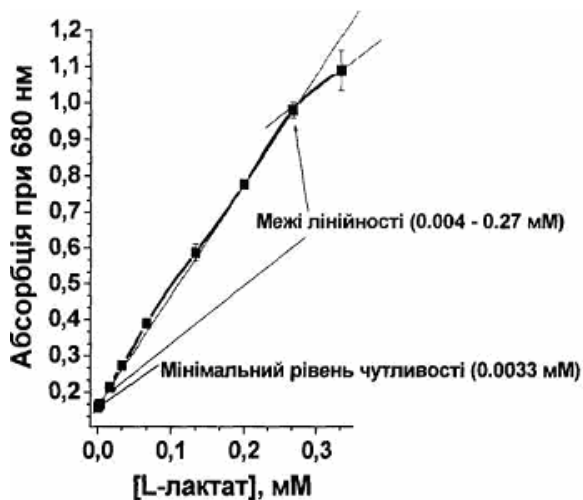


Fig. 3