



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 75190

(13) U

(51) МПК

G01N 33/02 (2006.01)

G01N 33/18 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

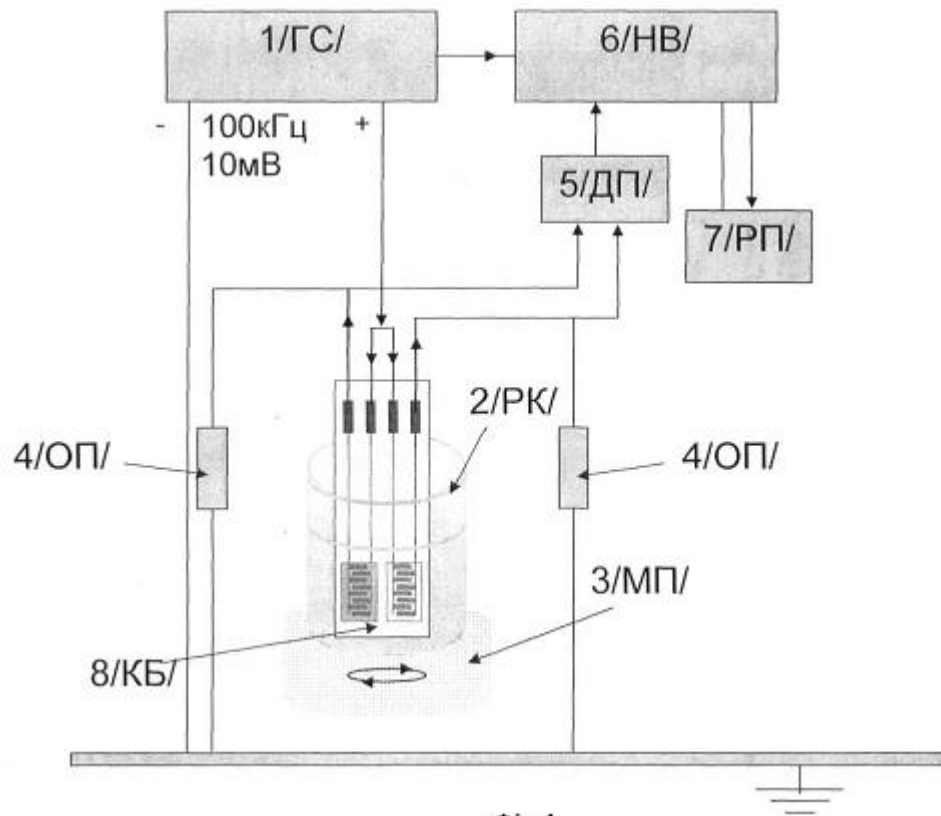
(21) Номер заявки: u 2012 05254	(72) Винахідник(и): Дудченко Олександр Євгенович (UA), Пешкова Вікторія Миколаївна (UA), Дзядевич Сергій Вікторович (UA), Солдаткін Олексій Петрович (UA)
(22) Дата подання заявки: 27.04.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 26.11.2012	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.11.2012, Бюл.№ 22	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Ак. Заболотного, 150, м. Київ, 03680 (UA)
	(74) Представник: Хоменко Ірина Іванівна, реєстр. №363

(54) КОНДУКТОМЕТРИЧНА БІОСЕНСОРНА СИСТЕМА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ФРУКТОЗИ У РОЗЧИНІ

(57) Реферат:

Кондуктометрична біосенсорна система для визначення концентрації фруктози у розчині належить до біотехнології та харчової промисловості і може бути використана, зокрема, для визначення концентрації фруктози в біотехнологічних зразках та харчових продуктах.

UA 75190 U



Фиг. 1

Корисна модель належить до біотехнології та харчової промисловості і може бути використана, зокрема, для визначення концентрації фруктози в біотехнологічних зразках та харчових продуктах, а більш конкретно - до кондуктометричної біосенсорної системи для визначення концентрації фруктози у розчині.

В наш час найперспективнішою сировиною для виробництва кондитерських виробів для хворих на цукровий діабет поряд з ксилітом, сорбітом, ізомальтом та іншими вважається фруктоза, вона добре засвоюється та на відміну від глюкози не потребує присутності інсуліну. Технологія виготовлення дієтичних продуктів харчування, як правило, передбачає вхідний контроль сировини, а також контроль готової продукції, при цьому кількісний вміст різноманітних компонентів, зокрема фруктози, є одним з показників, що свідчить про якість [3].

В медицині визначення фруктози, як правило, здійснюють при проведенні спермограми. Рівень фруктози у спермі є важливим показником для діагностики обструктивної азооспермії, запалень сім'яних пухирців, передміхурової залози та бульбоуретральних залоз у чоловіків. Також аналіз на рівень фруктози у спермі може сприяти коректній діагностиці ретроградної еякуляції [4, 5].

На сьогодні існує низка стандартних методів визначення фруктози, таких як хроматографія, спектрофотометрія. Їх недоліком є потреба в наявності кваліфікованого персоналу, складне і дороге обладнання, необхідність досить складної попередньої підготовки проб для аналізу. Інші методи (хімічні методи, поляриметрія, рефрактометрія) є простішими і швидкими, але менш точними та селективними. На противагу їм біосенсиори є більш зручними, точними, селективними, швидкими та дешевими приладами. Створення кондуктометричної біосенсорної системи для визначення концентрації фруктози може спростити та покращити систему моніторингу вмісту фруктози в харчових продуктах та в медичній діагностиці.

На сьогодні розроблено ряд ферментних біосенсорів для визначення фруктози, до складу яких входять різні ферменти, та у роботі яких використовуються різні медіатори електронів. Наприклад в роботі [1] авторами розроблено ферментний амперометричний біосенсор на основі ферменту фруктозодегідрогенази для визначення фруктози в зразках харчових продуктів. Фермент включений в карбонову пастову матрицю разом з медіатором $\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}$. При стаціонарному способі аналізу лінійний діапазон визначення фруктози даного біосенсора становив 0,2-20 мМ, а нижня межа визначення складала 35 мкМ. При проточно-інжекційному способі аналізу вихідний струм був прямопропорційний концентрації D-фруктози в діапазоні 0,5-15 мМ, а нижня межа визначення складала 115 мкМ. Максимальні відгуки було одержано при використанні ацетатного буферного розчину, рН 5,0-5,5. Також з'ясовано, що оптимальна температура, що дозволяє запобігти деактивації ферменту, становить 25 °С. Дослідження операційної стабільності показали, що біосенсор дає практично незмінний відгук протягом 4 годин постійних вимірювань, після чого спостерігається поступове падіння його активності. При зберіганні біосенсора в сухих умовах при 4 °С відгук не падав протягом тижня, а у випадку зберігання при 4 °С у 0,1 М ацетатному буферному розчині з рН 5,0 - відгук на внесення фруктози знизився на 75 % вже на другу добу. Проте така система вимагає використання складного електрода порівняння, що вносить вклад в дороговизну методу.

У роботі [2] повідомляється про розробку амперометричного біосенсора для визначення фруктози, який створений на основі золотого електрода, модифікованого 4-меркаптотетратіафулваленом та фруктозодегідрогеназою з метою покращення обміну електронами між іммобілізованим ферментом і поверхнею електрода. Найменша межа визначення фруктози становила 42 мкМ. Лінійний діапазон визначення фруктози складав 1 мкМ - 0,1 мМ. Показано, що аскорбінова кислота чинить інтерферуючий вплив на відгук біосенсора, що є особливо небажаним при визначенні фруктози у соках, фруктових напоях тощо. Сигнал такого біосенсора залишався стабільним протягом доби, а на другий день відгук на фруктозу складав 30 % від початкового, що говорить про недостатню стабільність при зберіганні біосенсора.

Також відомий одноразовий амперометричний біосенсор [6] на основі фруктозодегідрогенази, яку іммобілізували на поверхні платинового кінця карбонового електрода в полімерній матриці суміші поліетиленаміну та полікарбамоїлсульфонату. Лінійний діапазон визначення фруктози складав 3-13 мМ. Найменша концентрація фруктози, яку дозволяв визначати такий біосенсор, становила 0,65 мкМ. Визначено, що оптимальне значення рН для роботи біосенсора дорівнювало 5,4, а температура, при якій одержані найвищі відгуки, становить 39,9 °С. При температурі 44,9 °С відгук на фруктозу починав знижуватись. Описаний біосенсор передбачає використання складних у виготовленні електродів і не дає можливості багаторазового використання.

Отже, наведені приклади біосенсорів є амперометричними, проте на сьогодні немає жодних розробок біосенсорів на основі кондуктометричних перетворювачів для визначення фруктози. Кондуктометричні біосенсиори мають ряд переваг порівняно із амперометричними, які полягають у відсутності технологічно складного електрода порівняння; використанні при роботі змінної

напруги малої амплітуди, що дозволяє уникнути фарадеївських процесів на електродах, результатом чого є нечутливість кондуктометричних біосенсорів до електроактивних речовин, таких як аскорбінова кислота тощо; низькій собівартості (виготовлення кондуктометричних перетворювачів за недорогою сучасною тонкоплівчастою технологією).

Під час вивчення літератури автори не виявили кондуктометричних біосенсорних систем

для визначення концентрації фруктози у розчині, тому в основу запропонованої корисної моделі

поставлено задачу створення кондуктометричної біосенсорної системи для визначення

концентрації фруктози у розчині, яка б дозволила селективно визначати фруктозу у

досліджуваних зразках.

Поставлена задача вирішується запропонованою кондуктометричною біосенсорною

системою для визначення концентрації фруктози у розчині, що містить кондуктометричну

установку, вимірювальну комірку для реакційної суміші з фериціанідом калію та

кондуктометричний біосенсор, який складається з перетворювача на основі двох ідентичних пар

планарних золотих електродів, розміщених на підкладці з ситалу, при цьому на першу пару

електродів нанесена ферментна мембрана з фруктозодегідрогеназою, чутлива до фруктози, а

на другу пару електродів нанесена порівняльна мембрана, в якій знаходиться еквівалентна

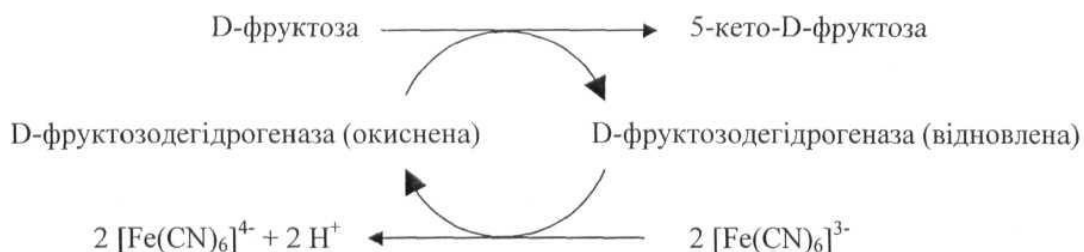
кількість сироваткового альбуміну бика, а виходи вказаного кондуктометричного біосенсора

підключені до відповідних входів кондуктометричної установки, яка підключена до джерела

живлення.

В основі роботи кондуктометричної біосенсорної системи для визначення фруктози лежить

наступна ферментативна реакція:



D-фруктозодегідрогеназа каталізує окиснення D-фруктози до 5-кето-D-фруктози з одночасним відновленням ферменту. Зворотне окиснення відновленої D-фруктозодегідрогенази здійснюється за допомогою електронного медіатора фериціаніду калію, який додають у вимірювальну комірку ще до внесення досліджуваного зразка. В результаті даної реакції утворюється відновлений фероціанід та протони, внаслідок чого змінюється провідність в розчині, яку можливо реєструвати за допомогою кондуктометричної біосенсорної системи для визначення концентрації фруктози [7].

Суть корисної моделі пояснюється графічними матеріалами, де:

на фіг. 1 схематично показано блок-схему пропонованої кондуктометричної біосенсорної системи;

на фіг. 2 показано кондуктометричний біосенсор для визначення фруктози;

на фіг. 3 показано калібрувальний графік залежності зміни провідності від концентрації фруктози, вимірювання проводились у 7,5 мМ цитрат-фосфатному буферному розчині, pH 5,0;

на фіг. 4 показано відтворюваність сигналу фруктозного біосенсора на внесення 0.25 мМ фруктози у розчин, вимірювання проводились у 7,5 мМ цитрат-фосфатному буферному розчині, pH 5,0.

Кондуктометрична біосенсорна система для визначення концентрації фруктози у розчині складається з вже відомої кондуктометричної установки [8], що включає генератор змінного струму 1/ГС/, робочу комірку для досліджуваного розчину 2/РК/, магнітний перемішувач 3/МП/, опори навантаження 4/ОП/, диференційний підсилювач 5/ДП/, фазочутливий нановольтметр 6/НВ/, реєструючий прилад 7/РП/. Система включає також кондуктометричний біосенсор 8/КБ/, який складається з двох ідентичних пар планарних золотих електродів 9, 10, 11, 12 (фіг. 2), при цьому на першу пару електродів 9, 10 нанесена ферментна мембрана 13/ФМ/, що містить фермент фруктозодегідрогеназу, чутливу до фруктози, на другу пару електродів 11, 12

нанесена порівняльна мембрана 14/ПМ/, що містить бичачий сироватковий альбумін (БСА) замість ферменту. Вся кондуктометрична біосенсорна система підключена до джерела живлення.

Імобілізацію фруктозодегідрогенази в складі ферментної мембрани 13/ФМ/ на поверхні 5 електродів проводили за допомогою глутарового альдегіду. Для створення розчину для ферментної мембрани 13/ФМ/ кондуктометричного біосенсора 8/КБ/ готували розчин з вмістом 10 % фруктозодегідрогенази, 10 % БСА, 20 % гліцерину у 20 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,5. Гель для порівняльної мембрани 14/ПМ/ робили таким же чином, але замість 10 ферменту використовували 10 % БСА. До складу гелю додавали гліцерин для стабілізації 10 ферменту при імобілізації та запобігання передчасному підсиханню розчину, нанесеного на 10 поверхню перетворювача. В свою чергу, БСА в складі ферментної мембрани 13/ФМ/ відігравав роль стабілізуючого агента для ферментів. Перед нанесенням на поверхню електродів приготовані розчини змішували з 1 % водним розчином глутарового альдегіду у співвідношенні 1:1. Нанесення проводили за допомогою мікропіпетки Eppendorf (0,1-2,5 мкл). Після нанесення 15 мембрани на поверхню електродів кондуктометричний біосенсор 8/КБ/ витримували 30-50 хвилин на повітрі при кімнатній температурі, а потім відмивали від надлишку ГА у буферному розчині протягом 10 хв.

Вимірювання при використанні кондуктометричних перетворювачів у складі 20 кондуктометричної біосенсорної системи для реєстрації перебігу ферментативних процесів проводилися за схемою, представленою на фіг. 1. З низькочастотного генератора сигналів (ГС-112.1) 1/ГС/ подавалася змінна напруга 10 мВ з частотою 100 кГц на гребінчасті електроди 10, 11 кондуктометричного біосенсора, який знаходився в комірці з розчином, що досліджувався. На пару електродів 9, 10 була нанесена ферментна мембрана 13/ФМ/, а на іншу пару електродів 11, 12 - порівняльна мембрана 14/ПМ/. В схемі використовувалися опори 25 навантаження 4/ОП/ $R_H=1$ кОм, які були підключені до електродів 9, 12. Вихідні сигнали знімалися з відповідних опорів навантаження і поступали на диференційний підсилювач 5/ДП/ типу Unipan-233-6 (Польща). Звідти диференційний сигнал надходив до селективного нановольметра 6/НВ/ типу Unipan-233 (Польща), а потім до самореєструючого пристрою 7/РП/. Одержані значення провідності були пропорційними концентрації фруктози в розчині, яку 30 визначали, користуючись калібрувальним графіком.

Калібрувальний графік (фіг. 3) отримували, вимірюючи величину сигналу фруктозної кондуктометричної біосенсорної системи на різні концентрації фруктози. Лінійна залежність між 35 концентрацією фруктози, яку додавали у робочу комірку, та відгуком розробленої кондуктометричної біосенсорної системи спостерігалась в діапазоні концентрації фруктози 0,001-1,5 мМ. Кондуктометрична біосенсорна система для визначення фруктози характеризувалася ширшим діапазоном визначення концентрації фруктози, ніж розроблені раніше амперометричні біосенсиори [1, 2, 6] (таблиця).

Таблиця

Порівняльна таблиця лінійних діапазонів деяких відомих біосенсорів для визначення концентрації фруктози

Тип біосенсора	Лінійний діапазон вимірювання, мМ
Амперометричний, [4]	0,2-20 мМ
Амперометричний, [13]	0,001-0,1 мМ
Амперометричний, [20]	3-13 мМ
Кондуктометрична біосенсорна система для визначення фруктози в розчині	0,001-1,5 мМ

Також було проведено ряд дослідів по вивченню відтворюваності сигналу 40 кондуктометричної біосенсорної системи на внесення фруктози у робочу комірку (Фіг.4). Вимірювання проводилися в 7,5 мМ цитрат-фосфатному буферному розчині, рН 5,0. Кондуктометрична біосенсорна система характеризувалася високою відтворюваністю сигналу, відносно стандартне відхилення результатів становило 3,0 %.

Джерела інформації:

1. Paredes P.A., Parellada J., Fernandez V.M., Katakis I., Dominguez E. Amperometric mediated carbon paste biosensor based on D-fructose dehydrogenase for the determination of fructose in food analysis // Biosensors & Bioelectronics.-1997. - Vol. 12. - №. 12. - P. 1233-1243.

2. Campuzano S., Escamilla-Gomez V., Herranz M.A., Pedrero M, Pingarron J.M. Development of amperometric biosensors using thiolated tetrathiafulvalene-derivatised self-assembled monolayer modified electrodes // *Sensors and Actuators B: Chemical*.-2008.-134. - P. 974-980.

3. Дорохович В. Фруктоза имеет наибольшую сладость среди заменителей сахара // Хлібопекарська і кондитерська промисловість України. - №. 1.-2011. - С. 38-39.

4. Lu J., Chen F., Xu H., Huang Y., Lu N. Standardization and Quality Control for Determination of Fructose in Seminal Plasma // *Journal of Andrology*. - V. 28. - No. 2.-2007. - P.207-213.

5. Anderson R., Reddy J.M. Jr., Oswald C, Zaneveld L.J.D. Enzymic Determination of Fructose in Seminal Plasma by Initial Rate Analysis // *Clinical Chemistry*. - V. 25. - No. 10.-1979. - P. 1780-1782.

6. Trivedi U.B., Lakshminarayana D., Kothari I.L., Patel P.B., Panchal C.J. Amperometric fructose biosensor based on fructose dehydrogenase enzyme // *Sensors and Actuators B: Chemical*.-2009.-136. - P. 45-51.

7. Parellada J., Dominguez E., Fernandez V.M. Amperometric flow injection determination of fructose in honey with a carbon paste sensor based on fructose dehydrogenase // *Analytica Chimica Acta*.-1996.-330. - P. 71-77.

8. Soldatkin O.O., Peshkova V.M., Dzyadevych S.V., Soldatkin A.P., Jaffrezic-Renault N., El'skaya A.V. Novel sucrose three-enzyme conductometric biosensor // *Materials Science and Engineering*.-2008.-28. - P. 959-964.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Кондуктометрична біосенсорна система для визначення концентрації фруктози у розчині, що містить кондуктометричну установку, вимірювальну комірку для реакційної суміші з фериціанідом калію та кондуктометричний біосенсор, який складається з перетворювача на основі двох ідентичних пар планарних золотих електродів, розміщених на підкладці з ситалу, при цьому на першу пару електродів нанесена ферментна мембрана з фруктозодегідрогеназою, чутлива до фруктози, а на другу пару електродів нанесена порівняльна мембрана, в якій знаходиться еквівалентна кількість сироваткового альбуміну бика, а виходи вказаного кондуктометричного біосенсора підключені до відповідних входів кондуктометричної установки, яка підключена до джерела живлення.

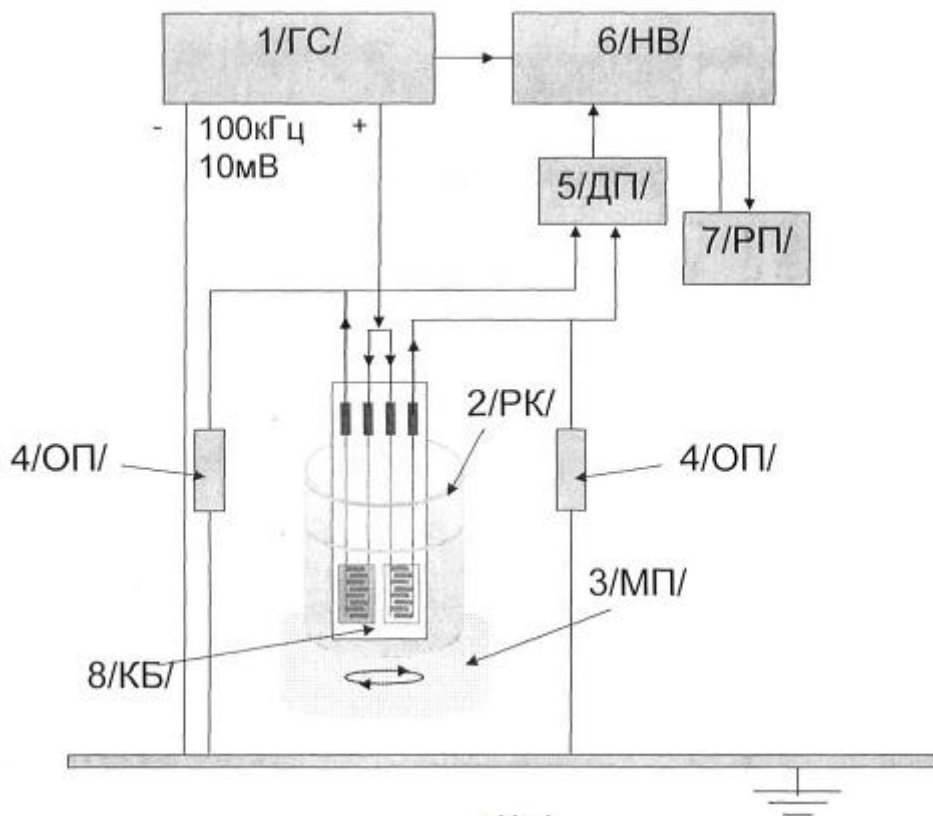
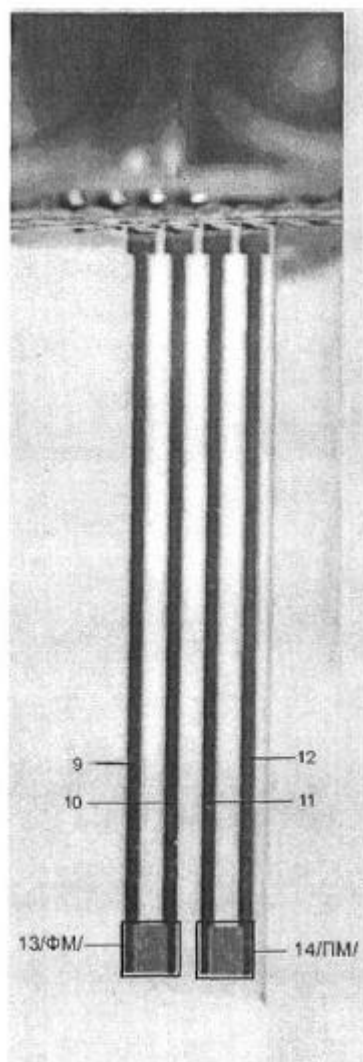
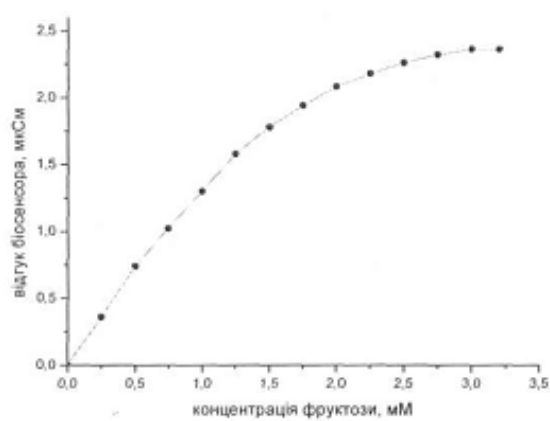


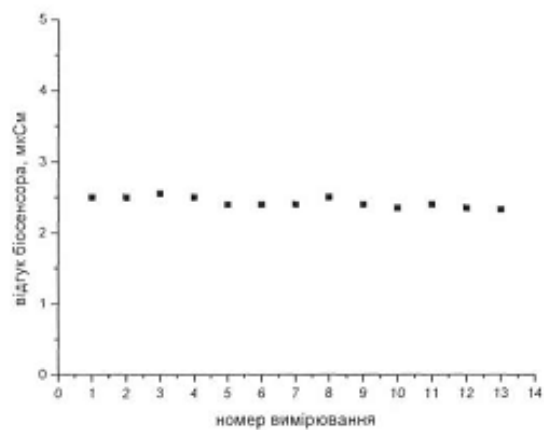
Fig. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601