

BIOSENSORS

БІОСЕНСОРИ

УДК 543.635.2+ 544.076 + 577.152.1 + 577.152.3

БІОСЕНСОРИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ДЕЯКИХ НАЙПОШИРЕНІШИХ ВУГЛЕВОДІВ

О. Є. Дудченко^{1,2}, В. М. Пешкова², О. О. Солдаткін², С. В. Дзядевич^{1,2}

¹Інститут високих технологій Київського національного університету ім. Тараса Шевченка, Київ

²Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України, Київ

E-mail: dc182@yandex.ru

БІОСЕНСОРИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ДЕЯКИХ НАЙПОШИРЕНІШИХ ВУГЛЕВОДІВ

О. Є. Дудченко, В. М. Пешкова, О. О. Солдаткін, С. В. Дзядевич

Анотація. В даній роботі розглянуто традиційні та новітні підходи до створення біосенсорів для кількісного визначення деяких з найпоширеніших вуглеводів. Висвітлено сучасні методи іммобілізації біологічного матеріалу на поверхні твердих носіїв (фізичних перетворювачів) з метою пошуку найефективніших тактик для розробки електрохімічних біосенсорів та оптимізації їхньої роботи. Приведено приклади практичного застосування лабораторних прототипів таких аналітичних приладів.

Ключові слова: вуглеводи, кількісний аналіз, біосенсори, глюкоза, сахароза, мальтоза, лактоза, фруктоза.

BIOSENSORS FOR DETERMINATION OF THE MOST COMMON CARBOHYDRATES

O. Ye. Dudchenko, V. N. Pyeshkova, A. A. Soldatkin, S. V. Dzyadevych

Abstract. Classic and modern approaches for design of biosensors for determination of common carbohydrates have been described in this paper. Modern methods of immobilization of biological materials (bioselective elements) on the surface of solid carriers (physical transducers) have been also presented in order to determine the most effective tactics for the development and optimization of electrochemical biosensors. Examples of practical application of some laboratory prototypes of such analytical devices have been showcased in text.

Keywords: carbohydrates, quantification, biosensors, glucose, sucrose, maltose, lactose, fructose.

БИОСЕНСОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕКОТОРЫХ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ УГЛЕВОДОВ

А. Е. Дудченко, В. Н. Пешкова, А. А. Солдаткин, С. В. Дзядевич

Аннотация. В представленной работе рассмотрены как традиционные, так и новейшие подходы к созданию биосенсоров для определения некоторых наиболее распространенных углеводов. В обзоре приведены современные методы иммобилизации биологического материала на поверхности твердых носителей (физических преобразователей) с целью обнаружения самых эффективных тактик для разработки электрохимических биосенсоров и оптимизации их работы. Предложены примеры практического применения лабораторных прототипов таких аналитических приборов.

Ключевые слова: углеводы, количественный анализ, биосенсоры, глюкоза, сахароза, мальтоза, лактоза, фруктоза.

Вступ. Кількісний аналіз є основним на стадії контролю якості сировини та готової продукції для харчових, біотехнологічних та фармацевтичних виробництв, використовується в медичній діагностиці, є інструментом екологічного моніторингу. Сучасні традиційні методи високоточного визначення вуглеводів потребують наявності кваліфікованого персоналу та складного і дорогого обладнання, яке необхідне для рідинної, газової хроматографії та ряду фізико-хімічних методів. Іншими недоліками наведених вище методів є необхідність досить складної попередньої підготовки проб для аналізу. Інші методи, такі як поляриметрія та рефрактометрія, є простими і швидкими, але менш точними та селективними. Всі хімічні методи аналізу потребують значних витрат часу і є доволі трудомісткими.

Вміст вуглеводів в продуктах харчування та напоях є важливим технологічним і нутриційним показником. Наприклад, кількість сахарози в цукровому буряку визначає ефективність технологічного процесу отримання цукру на всіх етапах його виробництва: від вирощування буряка і його збереження до повної переробки і одержання продукту. У молочній промисловості вміст лактози в молоці є важливим для процесу ферментації при виробництві кисломолочних продуктів. Величезне значення в харчовій

промисловості відіграє також мальтоза, вміст якої в мальтозній патоці визначає якість кінцевого продукту виробництва (пива, квасу тощо). Фруктоза зараз часто використовується як відмінний цукрозамінник при виробництві широкого ряду дієтичних продуктів.

Слід відзначити також високу необхідність визначення глюкози, фруктози та деяких інших вуглеводів в організмі людини з діагностичною метою.

Биосенсоры для визначення глюкози та приклади їх застосування

Глюкоза, або виноградний цукор, міститься практично в усіх плодах, найбільше її в солодких фруктах та ягодах. Глюкозний залишок входить до складу дисахаридів (сахарози, мальтози, лактози, тощо), полісахаридів (крохмалю, глікогену, целюлози, декстринів та ін.), глікопротеїнів, гліколіпідів, ліпополісахаридів та глікозидів. Глюкоза, одержана шляхом кислотного гідролізу крохмалю, слугує для виготовлення лікарських засобів. В кондитерській галузі, як правило, використовують патоку, в якій міститься глюкоза. Рівень глюкози в крові людини є показником для діагностики деяких патологічних станів.

Переважає більшість розроблених на сьогодні біосенсорів для визначення глюкози є електрохімічними, а саме амперометричними.

В основі функціонування таких біосенсорів зазвичай лежить ферментативна реакція окиснення глюкози. Найчастіше як біоселективний елемент для розробки електрохімічних біосенсорів використовують глюкозооксидазу (ГОД), яка має високу специфічність до глюкози та достатньо високу стабільність, проте існують і варіанти з використанням кількох ферментів одночасно, та біосенсори з використанням медіаторів. Відомі також біосенсори на основі іммобілізованих мікробних клітин, як, наприклад, біосенсор на основі генно-інженерного штаму *Escherichia coli*, котрий продукував глюкозодегідрогеназу, яка переважно локалізувалася на зовнішній мембрані клітини [1]. Суспензія бактеріальних клітин адсорбувалася на попередньо модифікованому багат шаровими вуглецевими нанотрубками (БВН) скловуглецевому електроді (СВЕ), а потім вкривалася шаром нафіону. Такий біосенсор не реагував на низку вуглеводів, що можуть бути присутні у досліджуваній рідині, при визначенні глюкози в зразках соків демонстрував високу кореляцію з даними, одержаними контрольними методами.

В останні роки з метою покращення аналітичних характеристик біосенсорів для іммобілізації ферментів на поверхні фізичних перетворювачів застосовують різноманітні нанокompозитні матеріали. Одними з таких, що широко використовуються, є одношарові та багат шарові вуглецеві нанотрубки (ОВН та БВН). Наприклад, автори [2] описують техніку іммобілізації ГОД методом фізичної сорбції на пористому електроді з індій-олов'яного оксиду, покритого шаром ОВН та TiO_2 для створення амперометричного глюкозного біосенсора. Показано підвищення чутливості біосенсора до глюкози з використанням нанотрбок. БВН в поєднанні з наночастинками золота та SnO_2 також використовувалися для іммобілізації ГОД на поверхні СВЕ методом простої фізичної сорбції. В результаті був одержаний високоселективний амперометричний біосенсор з широким лінійним діапазоном визначення глюкози (4 – 24 мМ) та високою операційною стабільністю [3].

Ще одним з поширених матеріалів, за допомогою якого модифікують електрод для подальшої іммобілізації біоселективних елементів є графен та його похідні. Так у роботі [4] описано метод утворення біокompозиту з ГОД, БВН та оксиду графену і його іммобілізацію на поверхні СВЕ. Оксид графену додатково утримував ГОД завдяки взаємодії своїх негативно заряджених груп з NH_2 -групами ферменту. Лінійна залежність відгуку такого амперометричного біосенсора на внесення глюкози спостерігалась в межах від 0,05 до 23,3 мМ субстрату, а найменша концентрація глюкози, що визначалась становила 0,028 мМ. Описано також біосенсор на основі ГОД, яка іммобілізувалася разом з композитом TiO_2 -графен на поверхні СВЕ [5]. Біосенсор додатково вкривався нафіоновою мембраною, що дозволяє підвищити селективність біосенсора.

Автори [6] повідомляють про метод виготовлення глюкозооксидазного біосенсора, в якому фермент був іммобілізований на негібридизованому TiO_2 масиві нанотрбок, який синтезувався на титановій пластинці потенціостатичною анодизацією. Методика описує оптимізований спосіб ковалентної зшивки фермента з глутаровим альдегідом (ГА) та бичачим сироватковим альбуміном (БСА), коли одна альдегідна група ГА реагує з аміногрупою БСА, а інша - з аміногрупою ГОД. Масив нанотрбок TiO_2 попередньо відмочували в фосфатному буферному розчині, щоб утворити гідрофільну поверхню, на яку наносили суміш БСА та ГА, а на завершальній стадії ГОД. Таким чином ГОД реагувала з вільними альдегідними групами ГА і знаходилась на поверхні.

Для іммобілізації біологічного матеріалу продовжують успішно використовувати метод захоплення у полімерну матрицю [7]. Автори [8] модифікували простий метод електрополімеризації ГОД в шарі пірролу на поверхні золотого електрода включенням до суміші полімера впорядкованого мезопористого вуглецю та платинових наночастинок з середнім розміром ~ 5 нм. Це дозволило досягнути підвищеної чутливості біосенсора

завдяки електрокаталітичним властивостям платинових наночастинок по відношенню до пероксиду водню, який генерується в ході ферментативної реакції. У роботі [9] також описується схожий метод використання платинових наночастинок, але вже для створення медіаторного амперометричного біосенсора на основі ГОД. Платиновий електрод попередньо модифікували полівінілфероцен перхлоратом ($PVF^+ClO_4^-$) та наночастинами платини. Фермент іммобілізували на поверхні модифікованого електрода методом електрополімеризації з о-фенілендіаміном. Завдяки використанню платинових наночастинок вдалось розширити лінійний діапазон з 0,11 – 7,03 мМ до такого, що становив 0,06 – 9,64 мМ глюкози з лімітом детекції 0,018 мМ. Глюкозооксидазний біосенсор, в якому фермент захоплювали в матрицю полі-о-фенілендіаміну методом електрополімеризації також успішно використовували для визначення іонів металів у рідинах, реалізуючи інгібіторний аналіз [10].

Повідомляється про розробку амперометричного біосенсора для визначення глюкози в сльозній рідині, що сконструйований у вигляді контактної лінзи [11]. Біосенсор створений на основі гнучких Pt та Ag/AgCl електродів, що інтегровані в контактну лінзу з полідиметил силоксану. На активну поверхню датчика іммобілізували ГОД в кополімерній матриці, змішуючи 2-метакрилоілоксиетил фосфорилхолін і 2-етилгексил метакрилат. Такий біосенсор був протестований на кролях, під час чого спостерігалась висока кореляція рівня глюкози в сльозній рідині, виміряної за допомогою такого біосенсора, та глюкози в крові кролів, виміряної глюкометром.

Відома низка інших медіаторних біосенсорів для визначення глюкози. Один з таких був створений на основі ФАД-залежної глюкозодегідрогенази, яка іммобілізувалася на нанокompatитному електроді з БВН в шарах хітозану [12]. Принцип його функціонування полягав у амперометричній детекції відновленого медіатора електронів N-метилфеназоній метилсульфату, який приєднував електрони в ході дегідрогеназної реакції. Результати визначення

глюкози в реальних зразках таким біосенсором співвідносились з контрольними методами з високою кореляцією. Відомо, що використання медіаторів для роботи амперометричних біосенсорів при низьких значеннях прикладеного потенціалу дозволяє уникнути впливу інтерферуючих речовин, які можуть бути присутні у досліджуваному розчині, як наприклад аскорбінова, сечова кислоти та ін. Автори [13] використовували синтезований редокс-полімер на основі гексаамінорутений (III) хлориду ($Ru(NH_3)_6Cl_3$) для іммобілізації разом з ГОД методом поперечної зшивки ГА на поверхні СВЕ. Такий амперометричний біосенсор характеризувався високою селективністю та досить широким лінійним діапазоном визначення глюкози (0 – 10 мМ).

Існують біосенсори, біоселективна мембрана яких містить кілька ферментів, як приклад, пероксидаза хрину та ГОД на поверхні золотого електрода [14]. Пероксидаза хрину була інкапсульована пептидними нанотрубками з метою підвищення активності і стабільності фермента. Такі нанотрубки іммобілізувались разом з ГОД на золотому електроді, що був модифікований золотими наночастинами. Залежність амперометричних відгуків цього біосенсора від концентрації глюкози мала лінійний характер в межах 0,5 – 2,4 мМ. Біосенсор характеризувався високою відтворюваністю показань ($RSD = 1,95\%$), та після 1 місяця використання демонстрував відгук на глюкозу у розмірі 85% відносно початкового відгуку.

Повідомлялося про розробку амперометричного біосенсора на основі ГОД, яка іммобілізувалася на мембрані яєчної шкаралупи, котра була попередньо модифікована золотими наночастинами, а потім розміщена на кисневому електроді Кларка [15]. Такий біосенсор демонстрував достатньо низький ліміт детекції глюкози (0,0035 мМ) та високу операційну стабільність.

В роботі [16] розроблено біосенсор для визначення глюкози на основі нещодавно виділеної з *Corynascus thermophilus* целлобіозодегідрогенази, як альтернативу ГОД з полегшеним переносом електронів.

Фермент іммобілізувався на карбоновому електроді з ОВН та БВН простою сорбцією, а також сорбцією з подальшим зшиванням з біфункціональним реагентом (дигліцидиловий ефір поліетиленгліколю або ГА). Показано, що чутливість біосенсора до глюкози зростає приблизно вдвічі з використанням ГА, та приблизно в 3-5 разів з використанням дигліцидилового ефіру поліетиленгліколю порівняно з біосенсором без використання будь-якого зшиваючого агента. Коли проста фізична сорбція комбінується з методом поперечної зшивки підвищується також стабільність такого біосенсора.

Біосенсори для визначення сахарози та їх застосування

Сахароза, або буряковий цукор – найпоширеніший в природі дисахарид. Він складається з α -D-глюкозного та β -D-фруктозного залишків, з'єднаних між собою глікозидним зв'язком. Сахароза належить до невідновлюючих вуглеводів. Основним джерелом її отримання є коренеплід цукрового буряка, який містить до 23% сахарози, та цукрова тростина, стебла якої містять 10–18 % сахарози. Сахароза широко застосовується в харчовій промисловості (хлібопекарська, кондитерська галузі, консервування тощо)

В цілому, більшість сахарозних біосенсорів розробляється з перспективою подальшого практичного використання вже в якості комерціалізованих аналітичних приладів для потреб харчового, та біотехнологічного виробництва [17, 20].

В літературі описано низку лабораторних прототипів біосенсорів для визначення сахарози. Більшість біосенсорів функціонують на основі реакцій гідролізу сахарози і окиснення продуктів такої реакції, що каталізується мультиферментними системами (сумішами ферментів). Для іммобілізації таких біоселективних елементів застосовують численні методи та їх модифікації. Наприклад, в роботі [21] повідомляють про використання методу електрополімеризації суміші інвертази (ІНВ), мутаротази (МУТ) та ГОД в матриці фенілєндіаміну на поверхні електроду. В

результаті такого каскаду реакцій відбувається виділення перекису водню, що може бути зареєстроване амперометричним датчиком.

Повідомлялося також про успішне використання мікробних клітин для біосенсорної детекції сахарози [22]. Суспензія клітин *Sascharomyces cerevisiae* іммобілізувалася на нітроцелюлозній мембрані, яка розміщувалася на поверхні потенціометричного кисневого електроду, вкритого шаром тефлону. Щоб нівелювати вплив глюкози на роботу біосенсора додатково наносився ферментний шар з ГОД та каталазою, та діалізна мембрана. Інтерферуючий вплив глюкози був пригнічений приблизно в 5 разів і становив 3,5 % відносно відгуку на сахарозу, який приймався за 100%. Калібрувальний графік такого біосенсора описувався лінійною залежністю в межах 0,01 – 30 мМ сахарози, що є досить сприятливим показником.

Дуже широко для закріплення ферментів на носіях вживають метод перехресного зшивання за допомогою біфункціональних реагентів, одним з яких є ГА. Проте він може реагувати з активним центром деяких ферментів, знижуючи тим самим його активність. Показано, що для зменшення такого ефекту використовують білкові стабілізуючі реагенти, як, наприклад, желатин, тромбін, БСА та лізин [19].

Для іммобілізації ферментів автори [23] використовували полівінілацетатний матрикс. В цій роботі авторами було показано, що створення подвійного ферментного шару на поверхні електродів призводить до розширення лінійного діапазону визначення сахарози та глюкози порівняно з одношаровою мембраною.

Амперометричні біосенсори, чутливі до сахарози та глюкози, також успішно застосовувалися в інгібіторному аналізі для визначення іонів важких металів [24, 25]. Наприклад, в роботі [26] ІНВ та ГОД були коіммобілізовані захопленням в гель-матрицю агарози та гуарової камеді на поверхні ультрамікроелектрода ($d=25$ мкм).

З точки зору практичної інтеграції біосенсорних приладів для визначення

сахарози у виробничі біотехнологічні та харчові процеси існує ряд технічно- та технологічно-обумовлених обмежень та труднощів. Головні з них пов'язані із забезпеченням правильного пробовідбору під час проведення кількісного аналізу в режимі «онлайн» таким чином, щоб не відбувалось мікробної чи перехресної контамінації, а також усунення можливого температурного впливу на термолабільну біоселективну частину системи з боку біореакторів [27].

Біосенсори для визначення мальтози та приклади їх застосування

Мальтоза – солодовий цукор, дисахарид, який складається з двох залишків молекул глюкози. Вона виявлена в багатьох рослинах, проте в невеликих кількостях. Найбільше мальтози зустрічається в ячмінному, житньому, пшеничному солоді, вона також входить до складу пива, меду та меляси. Мальтоза утворюється переважно розщепленням крохмалю під дією амілази. Розщеплення мальтози до двох молекул глюкози відбувається під дією ферменту α -глюкозидази (АГЛ). Мальтоза в деяких випадках використовується як заміник сахарози в харчовій промисловості. Також мальтоза застосовується в мікробіології, при виробництві напоїв, дитячого й спортивного харчування, у хлібопекарстві, пивоварінні [28].

Біосенсори, які дозволяють визначати кількість мальтози можуть бути застосовані, головним чином, для аналізу сировини на пивоварних підприємствах, або для контролю кінцевого продукту для ряду харчових виробництв та заготівельних господарств. В деяких країнах було одержано повідомлення про фальсифікацію меду шляхом додавання мальтози з метою підвищення солодкості продукту [29], тож для виявлення фальсифікованих продуктів також можна застосовувати такі прилади.

При розробці електрохімічних мальтозних біосенсорів переважно використовують ферменти з різними варіантами їх іммобілізації. Ферментативна система, що функціонує у більшості таких біосенсорів зазвичай містить АГЛ та певну оксидазу.

Наприклад, у роботі [30] автори повідомляють про створення амперометричної сенсорної системи на основі вуглецевих електродів з використанням ферментів амілоглюкозидази та глюкозооксидази та медіатора 1,1'-фериціанідметанолу. Зазначену біоаналітичну систему використовували для одночасного визначення в розчині мальтози та глюкози. Оптимум рН роботи такої сенсорної системи становив 4,8. Лінійний діапазон зберігався до 40 мМ глюкози та 20 мМ мальтози. Біосенсори не втрачали активності протягом чотирьох місяців зберігання у сухому стані за температури 4°C.

Показано, що включення вуглецевих нанотрубок може дещо підвищити чутливість біосенсорів. Так, для формування біоактивної мембрани, графітовий електрод, модифікований хітозаном та вуглецевими нанотрубками, покривали біферментною сумішшю АГЛ та піранозоксидази та завершали коіммобілізацію поперечною зшивкою ГА [31]. Авторами було також досліджено залежність активності біосенсора від рН середовища, в ході чого було обрано фосфатний буферний розчин з рН 6,0 як оптимальний. Лінійна залежність між відгуком та концентрацією мальтози утвореного біосенсора спостерігалась в діапазоні 0,25 – 2 мМ. Слід зазначити, що через використання піранозоксидази очікуваною є реакція біосенсора на глюкозу, а також галактозу, ксилолу, та сахарозу, що слід враховувати при аналізі реальних зразків.

В роботі [32] описано амперометричний біосенсор для визначення мальтози, за допомогою якого автори пропонують визначати активність α -амілази, що гідролізує крохмаль до мальтози. При створенні біоселективної мембрани сенсора для визначення мальтози проводили іммобілізацію ГОД, МУТ та АГЛ на поверхні електродів за допомогою ГА. Для стабілізації молекул фермента використовували БСА та желатин. Біосенсор характеризувався лінійною залежністю величини відгуку від концентрації мальтози у діапазоні 0,1–3 мМ.

У публікації [35] повідомлено про створення амперометричного ферментного сенсора для

визначення вмісту мальтози в культуральній рідині. Такий біосенсор призначався для дослідження процесів ферментації, які супроводжуються зміною концентрації мальтози. Авторами встановлено, що за допомогою даного сенсора вміст мальтози в різних зразках культуральної рідини можна визначати в межах 0,2–4 мМ.

Авторами [36] описується біосенсор з іммобілізованими на його поверхні за допомогою ГА амілоглюкозидазою, ГОД та БСА, за допомогою якого визначали мальтозу, яка утворюється з крохмалю під дією α -амілази. Це дає можливість використовувати такий біосенсор для визначення кількості клейстеризованого крохмалю у зернових харчових продуктах, що слугує критерієм оцінки їхньої якості.

У роботі [37] повідомлялося про розробку біосенсора для визначення мальтози, одержаного іммобілізацією АГЛ, піранозоксидази, хітозану та вуглецевих нанотрубок методом зшивання за допомогою ГА. Лінійний діапазон визначення мальтози складав 0,25 – 2,0 мМ при температурі буферного розчину 35°C та рН 6,0. Таким біосенсором визначали мальтозу в пиві. Був розроблений біосенсор [38] для визначення активності α -амілази в людській слині, який базувався на визначенні кількості мальтози, утвореної з мальтопентаози (амілопентаози) в присутності α -амілази. На поверхні електроду були іммобілізовані АГЛ, ГОД, та МУТ. У роботі [41] описано високочутливий оптичний біосенсор на основі мальтодекстрин-зв'язуючого білку з *Escherichia coli*.

Отже, більшість існуючих на сьогодні біосенсорів для визначення мальтози є амперометричними. Але порівняно з кондуктометричними біосенсорами для визначення мальтози вони мають низку недоліків. Перш за все, це вимірювання з використанням високого потенціалу, що призводить до похибок через присутність у розчинах інших електроокиснювальних компонентів, таких, зокрема, як аскорбінова кислота. По-друге, існує необхідність у технологічно складному та дорогому електроді

порівняння. По-третє, це робота з високою напругою, що спричиняє фарадеївські процеси на електродах. До того ж амперометричні біосенсори, як правило, є дорожчими порівняно з кондуктометричними. В цілому, на відміну від інших електрохімічних біосенсорів кондуктометричні біосенсори є досить простими, зручними, точними та дозволяють вирішувати важливі науково-дослідні та виробничі завдання [39, 40].

Біосенсори для визначення лактози та приклади застосування

Лактоза – молочний цукор, дисахарид, утворений залишками D-галактози та D-глюкози. У молоці ссавців міститься у вільному вигляді (2–8,5 %) у двох аномірних формах: α - та β -лактоза. Її концентрація у коров'ячому молоці становить близько 4-5%. У рослинах практично не зустрічається. У тонкому кишечнику людей та тварин лактоза розщеплюється на глюкозу та галактозу під дією β -галактозидази. Завдяки вмісту лактози, з молока в результаті молочнокислого бродіння отримують різноманітні кисломолочні продукти. Лактоза широко використовується як допоміжна речовина у виготовленні таблетованих та капсульованих лікарських форм, а також при виробництві смакових та ароматичних добавок [42].

Більшість з відомих на сьогодні біосенсорів для визначення лактози є амперометричними та функціонують на основі коіммобілізації різних ферментів. Деякі автори також повідомляють про розробку біосенсорів для визначення лактози з використанням різних медіаторів, що дещо ускладнює систему визначення. Наприклад, в роботі [43] в якості робочого електроду використовували графітовий електрод з адсорбованим на нього медіатором ферроценом, а в роботі [44] в якості медіатора використовували аміносаліцилову кислоту.

В іншій роботі [45] автори повідомляють про створення біосенсора для визначення лактози на основі мікробних клітин *Kluyveromyces marxianus*, які містили фермент β -галактозидазу, та клітини *Gluconobacter*

oxydans з ферментом ГОД. Ці клітини були іммобілізовані з желатином на поверхні електродів за допомогою ГА. Перевага такого клітинного біосенсора була в тому, що клітини *Gluconobacter oxydans* були здатні окислювати обидва аномера глюкози, що давало можливість обходитись без ферменту МУТ. До того, авторами було відмічено, що додавання DEAE-декстрану та інозиту до біоселективної мембрани біосенсорів покращувало стабільність біосенсорів у 16 разів порівняно зі стабільністю біосенсорів без стабілізаторів.

В роботі [46] повідомляється про розробку біосенсора на основі ІСПТ для визначення лактози, до складу якого входила термофільна глюкокіназа та β -галактозидаза. Ферменти не втрачали активності при температурі +50 °С.

Третє покоління біосенсорів для визначення лактози представлено системами з прямим переносом електронів між ферментом та позитивно зарядженими одношаровими вуглецевими нанотрубками (ОВН) [47]. В роботі описано біосенсор на основі фізичної сорбції целобіозодегідрогенази на скловуглецевому електроді, з модифікованими арилдіазонієвою похідною п-фенілендіаміну ОВН. Лінійність калібрувального графіка такого амперометричного біосенсора спостерігалась в діапазоні концентрацій лактози 0,001 – 0,15 мМ при вимірюваннях в ацетатному буферному розчині рН 3,5.

Біосенсори для визначення фруктози та приклади їх застосування

Фруктоза є поширеним у природі моносахаридом, найбільше її міститься у фруктах, а саме у винограді, яблуках, грушах, бананах [48]. Вона входить також до складу бджолиного меду та олігосахаридів: рафінози, сахарози, стахіози, полісахаридів інуліну та левану. Завдяки своїй високій гігроскопічності фруктозу все частіше застосовують при виробництві мармеладів, цукерок, пряників, печива та інших солодощів, тому що вона дозволяє затримати процес черствіння продуктів. Окрім цього, в наш час фруктоза є одним з найперспективніших замінників

цукру при профілактиці та лікуванні цукрового діабету, адже вона добре засвоюється організмом людини, але на відміну від глюкози не потребує присутності інсуліну [49]. В деяких випадках рівень фруктози у продуктах харчування свідчить про якість останніх. Наприклад, кількість фруктози у бджолиному меді, а також співвідношення її з кількістю інших цукрів свідчить про зрілість меду, метод його виготовлення, кліматичні умови виготовлення та зберігання, ймовірність фальсифікації меду тощо [50]. Також відзначається, що фруктоза не сприяє розвитку зубного карієсу на відміну від глюкози або сахарози [48].

У людей надлишок фруктози в крові та сечі може свідчити про ряд патологічних станів, тому в медицині визначення фруктози також є дуже важливим. Наприклад, аналіз фруктози здійснюється при проведенні спермограми. Її рівень у спермі є важливим 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 [51, 52]

Більшість з відомих нині біосенсорів для визначення фруктози є електрохімічними та функціонують на основі ферментів. Існують також мікробні біосенсори для визначення фруктози. Повідомляється про розробку амперометричної біосенсорної системи для визначення фруктози, сахарози та глюкози з іммобілізованими на поверхні золотих електродів клітинами трьох різних мутантних штамів *Escherichia coli* K12, кожен з яких був специфічним до одного з трьох сахаридів [53].

В роботі більшості з нині існуючих біосенсорів для визначення фруктози використовуються фермент фруктозодегідрогеназа (ФДГ) та різні медіатори електронів. У роботах [54, 55] описано кілька варіантів ферментного амперометричного біосенсора, створених шляхом нанесення ФДГ, медіатора фероцена та нафіона у складі целюлозо-ацетатної мембрани на поверхню скловуглецевого електрода з метою запобігання вимивання медіатора з мембрани. Автори [56]

повідомляють про амперометричний біосенсор для визначення фруктози в зразках харчових продуктів на основі ферменту ФДГ, включеного в карбонову пастову матрицю разом з медіатором $\text{Os}(\text{bpy})_2\text{Cl}$. Повідомляється також про метод виготовлення амперометричного безмедіаторного біосенсора для визначення фруктози [57], в якому ФДГ також іммобілізується включенням в карбонову пасту, але з додатковим покриттям шару фермента діалізною мембраною. Авторами також відмічено вплив аскорбінової кислоти на вимірювання фруктози і з'ясовано, що при значних концентраціях аскорбінової кислоти в зразках ($>0,08$ мМ) такий вплив можна нівелювати, додатково модифікуючи електрод аскорбатоксидазою. В роботі [58] описано ферментний амперометричний біосенсор для визначення фруктози в системі проточно-ін'єкційного аналізу. Фермент ФДГ наносився на карбоновий пастовий електрод в складі попередньо одержаної суміші ФДГ і графітової пудри. Описано також фруктозні амперометричні біосенсори [59], які одержували, абсорбуючи ФДГ в графітій матриці з медіаторами фериціанідом або тетраціанохінодиметаном, з подальшим утворенням тонкого непровідного електрополімерного шару 1,3 фенілєндіамін-резорцинолу. Авторами [60] проведено порівняння двох різних процедур іммобілізації ФДГ для створення амперометричного біосенсора для визначення фруктози. В першому методі ФДГ іммобілізували в шарі поліпіролу на платиновому електроді з фериціанідом калію в якості медіатора за допомогою електрополімеризації. За іншим методом на платиновому електроді ФДГ іммобілізували ковалентним зв'язуванням з ГА на шарі поліпіролу з фериціанідом. В роботі [61] описано біосенсор для одночасного визначення глюкози і фруктози, який був створений коіммобілізацією суміші ГОД, ФДГ і медіатора тетрагіафулвалена методом поперечної зшивки з ГА на попередньо модифікованому меркаптопропіоновою кислотою золотому електроді. Повідомляється про розробку кількох варіантів біосенсора для визначення фруктози для функціонування у

складі трьохканального амперометричного мультибіосенсора для визначення глюкози, фруктози і етанолу [62]. Фруктоза визначається за допомогою ферменту ФДГ та одного з трьох медіаторів: фероцена, 2-гексадеканола, та фериціаніду, які іммобілізувалися в складі графітової суспензії. У кожному з трьох варіантів біосенсорів при вимірюваннях у реакційне середовище додавали 2 мМ фериціаніду калію. Біосенсор з фероценом мав найширший лінійний діапазон визначення, а біосенсор з 2-гексадеканоном характеризувався вищою операційною стабільністю за інші.

Незважаючи на велику кількість повідомлень про розробку амперометричних біосенсорів для визначення фруктози, досі ще не було налагоджено промислового випуску жодної такої системи. Можливо, на перешкоді цьому стоїть ряд недоліків амперометричних біосенсорів, таких як: використання технологічно складного та дорогого електроду порівняння; інтерферуючий вплив електроактивних речовин внаслідок окиснення їх на електроді, чого не відбувається при роботі з кондуктометричними біосенсорами. Крім цього, кондуктометричні біосенсори, завдяки своїй недорогій сучасній тонкплівчастій технології виготовлення, можна суттєво мініатюризувати, що зробить їх використання ще зручнішим. Розроблено кондуктометричний біосенсор, який функціонує з присутнім в реакційній суміші медіатором фероціанідом та ферментом фруктозодегідрогеназою, що іммобілізувалася на поверхні золотих планарних датчиків зшиванням з ГА [63].

Описано безмедіаторний кулонометричний біосенсор для визначення фруктози. На поверхні пористого вуглецевого електроду іммобілізували ФДГ. Такий біосенсор дозволяв визначати фруктозу в досить широкому діапазоні концентрацій (1-100 мМ). Результати аналізу напоїв мали високий ступінь кореляції з контрольними методами [64].

Методом трафаретного друку був вперше розроблений графеновий електрод, на поверхні якого іммобілізували ФДГ за допомогою біфункціонального реагента дигліцидилового ефіра поліетиленгліколю [65]. Для процеду-

ри іммобілізації використали осмій-вмісний полімер, який на електроді відігравав роль одночасно і медіатора електронів (Os^{3+}/Os^{2+}) і підкладки для іммобілізації ферменту.

Біосенсорні системи для одночасного визначення кількох вуглеводів

Вельми актуальною на сьогодні є пропозиція одночасного моніторингу кількох сполук під час виробничого процесу на харчових або фармацевтичних виробництвах. Це дозволило б суттєво скоротити затрати часу на стадіях контролю якості та оптимізувати технологічний процес в цілому. Можна виділити дві головні тактики у створенні біосенсорних систем, які дозволяють одночасно кількісно визначати декілька речовин у мультикомпонентних рідких сумішах: це розробка окремих моноспецифічних біосенсорів та підключення їх до одного багатоканального реєструючого приладу, або створення мультиферментних/клітинних біосенсорів, які матимуть специфічність одразу до кількох речовин, з використанням додаткових моноспецифічних біосенсорів [33, 34, 45, 46].

Розроблено потенціометричний мультибіосенсор [34], за допомогою якого одночасно визначають сахарозу, мальтозу та глюкозу в розчині, а також амперометричний мультибіосенсор [33], яким одночасно визначали ці самі вуглеводи та додатково лактозу.

В роботі [66] є повідомлення про створення амперометричного мультибіосенсора для визначення декількох сахаридів (лактози, мальтози, сахарози та глюкози). Авторами було показано також, що активність ферменту β -галактозидази в желатиновій мембрані більше ніж в альбуміновій.

На золотому дисковому електроді коіммобілізували інвертазу (ІНВ) та фруктозодегідрогеназу в шарі 3-меркаптопропіонової кислоти за технікою SEM (self-assembled monolayer) разом з медіатором електронів тетратіофулваленом [67]. Такий біосенсор не був повністю селективним до сахарози, а реагував також на фруктозу через присутність фруктозодегідрогенази у чутливій мембрані,

та відзначався впливом аскорбінової кислоти, який в подальшому можна було б нівелювати зниженням електричного потенціалу. Для одночасного визначення сахарози, глюкози та фруктози в системі для проточного аналізу було додатково застосовано біосенсори, чутливі до двох останніх моносахаридів.

Відомий оптичний флуориметричний біосенсор для одночасного визначення фруктози та глюкози, в якому фермент глюкозофруктозооксидоредуктаза іммобілізувався поперечним зшиванням з ГА, що, як показано авторами, навіть підвищувало стабільність біосенсора [68]. Такий біосенсор функціонував у системі для проточного аналізу.

Однак, попри високі перспективи використання систем одночасного моніторингу речовин, поки що немає відомостей про комерціалізацію та практичне впровадження подібних мультибіосенсорів для визначення вуглеводів в промисловості або медицині.

Висновки. Контроль вмісту деяких вуглеводів (глюкози, сахарози, мальтози, лактози) важливим є, як правило, в усіх галузях промисловості, де використовується рослинна та деякі види тваринної сировини (харчова промисловість, біотехнологічне виробництво), а також в медицині, екологічному моніторингу та фармації. На сьогодні існує багато методів визначення вуглеводів, найточніші та найспецифічніші з яких є, як правило, технологічно складними, адже потребують дорогого обладнання, висококваліфікованого персоналу, значних затрат часу. Альтернативою для таких аналітичних методів можуть бути біосенсорні технології.

Важливим питанням є іммобілізація ферментів на поверхні фізичних перетворювачів. Показано, що для іммобілізації біологічного матеріалу на поверхні фізичних перетворювачів можна використовувати різноманітні нові нанокompatитні матеріали, а також модифікувати за їх допомогою класичні техніки іммобілізації, що дає змогу покращити аналітичні характеристики біосенсорів. На противагу класичним методам аналізу вуглеводів, біосенсори є більш зручними,

точними, селективними, швидкими та дешевими приладами. Створенням біосенсорів для визначення вуглеводів можна спростити та покращити існуючі системи моніторингу вмісту вуглеводів при перебігу процесів біотехнологічного виробництва (культивуація, ферментація тощо) в різних галузях харчової промисловості, в медичній та фармакологічній

сферах. Особливо це стосується розробки та застосування на практиці мультибіосенсорів.

Основні характеристики розглянутих біосенсорів наведено в таблиці 1.

Представлені дані дають можливість вести мову про перспективність застосування біосенсорів для тих чи інших потреб у відповідності з робочими параметрами окремо взятого екземпляру.

Таблиця 1

Речовина, яка визначається	Фізичний метод реєстрації сигналу	Біоселективний елемент (фермент / система ферментів / клітина)	Лінійний діапазон визначення, мМ	Ліміт детекції, мМ	Посилання
Глюкоза	Амперометрія	Штам-продуцент глюкозодегідрогенази <i>E. coli</i>	0,5 – 8,0	-	1
Глюкоза	Амперометрія	ГОД	0,01 – 1,4	-	2
Глюкоза	Амперометрія	ГОД	4 – 24,0	-	3
Глюкоза	Амперометрія	ГОД	0,05 – 23,3	0,028	4
Глюкоза	Амперометрія	ГОД	0 – 8,0	-	5
Глюкоза	Амперометрія	ГОД	0,05 – 0,65	0,0038	6
Глюкоза	Амперометрія	ГОД	2 – 10,0	-	7
Глюкоза	Амперометрія	ГОД	0,05 – 3,7	0,05	8
Глюкоза	Амперометрія	ГОД	0,06 – 9,64	0,018	9
Глюкоза	Амперометрія	ГОД	0,03 – 5,0	-	11
Глюкоза	Амперометрія	ФАД-залежна глюкозодегідрогеназа	0,05 – 0,96/ 0,07 – 0,62	-	12
Глюкоза	Амперометрія	ГОД	0 – 10,0	-	13
Глюкоза	Амперометрія	Пероксидаза хрину та ГОД	0,5 – 2,4	-	14
Глюкоза	Амперометрія	ГОД	0,0083 – 0,966	0,0035	15
Глюкоза	Амперометрія	Целлобіозодегідрогеназа	0,025 – 30,0	0,01	16
Сахароза	Амперометрія	ІНВ, МУТ, ГОД	0,05 – 8,0	-	21
Сахароза	Потенціометрія	Клітини <i>Sascharomyces cerevisiae</i> та ГОД, каталаза	0,01 – 30,0	-	22
Сахароза	Амперометрія	Каталаза, ГОД, ІНВ	0 – 8,0	-	23
Мальтоза	Амперометрія	Амілоглюкозидаза, ГОД	0 – 20,0	-	29
Мальтоза	Амперометрія	АГЛ, піранозоксидаза	0,25 – 2,0	-	31

Речовина, яка визначається	Фізичний метод реєстрації сигналу	Біоселективний елемент (фермент / система ферментів / клітина)	Лінійний діапазон визначення, мМ	Ліміт детекції, мМ	Посилання
Мальтоза	Амперометрія	АГЛ, піранозооксидаза	0,25 – 2,0	-	37
Лактоза	Амперометрія	β-галактозидаза, ГОД, пероксидаза хрину	0,03 – 1	-	44
Лактоза	Амперометрія	Целобіозодешідрогеназа	0,001 – 0,15	0,0005	47
Фруктоза	Амперометрія	ФДГ, Os(bpy) ₂ Cl	0,2 – 20	0,035	56
Фруктоза	Амперометрія	ФДГ	0,2 – 2,0	-	57
Фруктоза	Амперометрія	ФДГ	0,075 – 10,0	0,075	58
Фруктоза	Амперометрія	ФДГ	0,01 – 1,0	0,01	59
Фруктоза	Амперометрія	ГОД, ФДГ, тетрагіафульвален	0,001 – 2,0	0,001	61
Глюкоза			0,001 – 10,0		
Фруктоза	Кондуктометрія	ФДГ, фероціанід	0,05 – 1,75	0,05	63
Фруктоза	Кулонометрія	ФДГ	1 – 100,0	-	64
Фруктоза	Амперометрія	ФДГ	0,1 – 8,0	0,0008	65
Сахароза	Амперометрія	ІНВ, з/без МУТ, ГОД	0,1 – 6,0 (з МУТ)	-	67
Мальтоза			0,6 – 44,0 (без МУТ)		
Лактоза			0,1 – 6,0 0,03 – 2,5		
Лактоза		β-галактозидаза, ГОД	0,3 – 6,0		
Сахароза	Амперометрія	ІНВ та фруктозодегідрогеназа	0,0012 – 3,0	0,00036	68
Глюкоза	Флуориметрія	Глюкозо-фруктозооксидоредуктаза	2,78 – 33,3	-	69
Фруктоза			0,278 – 55,5		

Примітка до таблиці: «-» – не наводиться

Список використаних джерел

1. Liang B., Li L., Tang X. J., Lang Q., Wang H., Li F., Shi J., Shen W., Palchetti I., Mascini M., Liu A. Microbial surface display of glucose dehydrogenase for amperometric glucose biosensor // Biosens. Bioelectronics. – 2013. – 45. – P.19–24.
2. Dung N. Q., Patil D., Duong T.T., Jung H., Kim D., Yoon S.G. An amperometric glucose biosensor based on a GOx-entrapped TiO₂–SWCNT composite // Sensors Actuators B. – 2012. – 166–167. – P. 103 – 109.
3. Li F., Songa J., Li F., Wang X., Zhang Q., Han D., Ivaska A., Niu L. Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on carbon nanotubes@SnO₂-Au composite // Biosens. Bioelectronics. – 2009. – 25. – P. 883–888.
4. Palanisamy S., Cheemalapati S., Chen S.M. Amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase dispersed in multiwalled carbon nanotubes/graphene

- oxide hybrid biocomposite // *Materials Science Engineering C*. – 2014. – 34. – P. 207–213.
5. *Jang H. D., Kim S.K., Chang H., Roh K.M., Choi J.W., Huang J.* A glucose biosensor based on TiO₂-Graphene composite // *Biosens. Bioelectronics*. – 2012. – 38. – P. 184–188.
 6. *Wang W., Xie Y., Wang Y., Du H., Xia C., Tian F.* Glucose biosensor based on glucose oxidase immobilized on unhybridized titanium dioxide nanotube arrays // *Microchim Acta*. – 2014. – 181. – P. 381–387.
 7. *Demirkıran N., Ekinçi E.* Immobilization of Glucose Oxidase in GLYMO/MTEOS Sol-Gel Film for Glucose Biosensor Application // *Acta Chim. Slov.* – 2012. – 59. – P. 302–306.
 8. *Jiang X., Wu Y., Mao X., Cui X., Zhu L.* Amperometric glucose biosensor based on integration of glucose oxidase with platinum nanoparticles/ordered mesoporous carbon nanocomposite // *Sensors Actuators B*. – 2011. – 153. – P. 158–163.
 9. *Turkmen E., Basa S. Z., Gulce H., Yildiz S.* Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized poly(o-phenylenediamine) film on platinum nanoparticles-polyvinylferrocenium modified electrode // *Electrochimica Acta*. – 2014. – 123. – P. 93–102.
 10. *Guascito M. R., Malitesta C., Mazzotta E., Turco A.* Inhibitive determination of metal ions by an amperometric glucose oxidase biosensor study of the effect of hydrogen peroxide decomposition // *Sensors Actuators B*. – 2008. – 131. P. 394–402.
 11. *Chu M. X., Miyajima K., Takahashi D., Arakawa T., Sano K., Sawada S., Kudo H., Iwasaki Y., Akiyoshi K., Mochizuki M., Mitsubayashi K.* Soft contact lens biosensor for in situ monitoring of tear glucose as non-invasive blood sugar assessment // *Talanta*. – 2011. – 83. – P. 960–965.
 12. *Monosik R., Stred'ansky M., Luspai K., Magdolen P., Sturdik E.* Amperometric glucose biosensor utilizing FAD-dependent glucose dehydrogenase immobilized on nanocomposite electrode // *Enzyme Microbial Technology*. – 2012. – 50. – P. 227–232.
 13. *Deng H., Teo A. K. L., Gao Z.* An interference-free glucose biosensor based on a novel low potential redox polymer mediator // *Sensors Actuators B*. – 2014. – 191. – P. 522–528.
 14. *Park B.W., Zheng R., Ko K., Cameron B. D., Yoon D.Y., Kim D.S.* A novel glucose biosensor using bi-enzyme in corporate with peptide nanotubes // *Biosensors Bioelectronics*. – 2012. – 38. – P. 295–301.
 15. *Zheng B., Xie S., Qian L., Yuan H., Xiao D., Choi M.M.F.* Gold nanoparticles-coated eggshell membrane with immobilized glucose oxidase for fabrication of glucose biosensor // *Sensors and Actuators B*. – 2011. – 152. P. 49–55.
 16. *Zafar M. N., Safina G., Ludwig R., Gorton L.* Characteristics of third-generation glucose biosensors based on *Corynascus thermophilus* cellobiose dehydrogenase immobilized on commercially available screen-printed electrodes working under physiological conditions // *Analytical Biochemistry*. – 2012. – 425. – P. 36–42.
 17. *Sosnitza P., Irtel F., Ulber R. Busse M., Faurie R., Fischer L., Schepfer T.* Flow injection analysis system for the supervision of industrial chromatographic downstream processing in biotechnology // *Biosens. Bioelectronics*. – 1998. – 13. – P. 1251–1255.
 18. *Surareungchai W., Worasing S., Sritongkum P., Tanticharoen M.; Kirtikara K.* Dual electrode signal-subtracted biosensor for simultaneous flow injection determination of sucrose and glucose // *Analytica Chimica Acta*. – 1999. – 380. – P. 7–15.
 19. *Gouda M.D., Kumar M.A., Thakur M.S., Karanth N.G.* Enhancement

- of operational stability of an enzyme biosensor for glucose and sucrose using protein based stabilizing agents // *Biosens. Bioelectronics.* – 2002. – 17. – P. 503–507.
20. *Mutlu S., Alp B., Ozmelles R.S., Mutlu M.* Amperometric Determination of Enzymatic Activity by Multienzyme Biosensors // *Journal of Food Engineering.* – 1997. – 33. – P.81–86.
21. *Klinchan S., Choti Wongpipat W., Suwannakum T.* Construction of Sensor Chip by Electrochemical polymerization Techniques for Sucrose Determination // *The Journal of KMITENB.* – 2002. – 12. – P.12–16.
22. *Rotariu L., Bala C., Magearu V.* Yeast cells sucrose biosensor based on a potentiometric oxygen electrode // *Analytica Chimica Acta.* – 2002. – 458. – P. 215–222.
23. *Popp J., Silber A., Brauchle C., Hampp N.* Sandwich enzyme membranes for amperometric multi-biosensor applications: improvement of linearity and reduction of chemical cross-talk // *Biosensors & Bioelectronics.* – 1995. – 10. – P.243–249.
24. *Bertocchi P., Ciranni E., Compagnone D., Magearu V., Palleschi G., Pirvutoiu S., Valvo L.* Flow injection analysis of mercury(II) in pharmaceuticals based on enzyme inhibition and biosensor detection // *J Pharmaceut Biomed Anal.* – 1999. – 20. – P.263–269.
25. *Mohammadi H., Amine A., Cosnier S., Mousty C.* Mercury-enzyme inhibition assays with an amperometric sucrose biosensor based on a trienzymatic-clay matrix // *Analytica Chimica Acta.* – 2005. – 543. – P.143–149.
26. *Bagal-Kestwal D., Karve M. S., Kakade B., Pillai V. K.* Invertase inhibition based electrochemical sensor for the detection of the metal ions in aqueous system: Application of ultra-microelectrode to enhance sucrose biosensor's sensitivity // *Biosens. Bioelectronics.* – 2008. – 24. – P. 657–664.
27. *Dzyadevych S.V.* Amperometric biosensors. Modern technologies and commercial variants // *Biopolymers and cell.* – 2002. – 18. – P. 363–376.
28. *Collins P.M., Ferrier R.J.* Monosaccharides: Their Chemistry and Their Roles in Natural Products. – Chichester: John Wiley & Sons, 1995. – 574 p.
29. *Fujita I.* Determination of Maltose in Honey // *International Journal of Food Science, Nutrition and Dietetics.* – 2012. – 1. – P. 1 – 3.
30. *Ge F., Zhang X.E., Zhan P., Zhang X.M.* Simultaneous determination of maltose and glucose using a screen-printed electrode system // *Antonie Van Leeuwenhoek.* – 1997. – V. 71, N 4. – P. 345 – 351.
31. *Odaci D., Telefoncu A., Timur S.* Maltose biosensing based on co-immobilization of α -glucosidase and pyranose oxidase // *Bioelectrochemistry.* 2010. – 79. – P. 108–113.
32. *Zajoncova L., Jilek M., Beranova V., Pec P.* A biosensor for the determination of amylase activity // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2004. – 20. – P. 240–245.
33. *Filipiak M., Fludra K., Gosciminska E.* Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of oxygen electrode // *Biosensors and Bioelectronics.* 1996. – 11, N 4. – P. 355–364.
34. *Aoki K., Uchida H., Katsube T., Ishimaru Y., Iida T.* Integration of enzymatic disaccharide sensors for simultaneous determination of disaccharides by means of light addressable potentiometric sensor // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. – 471. – P. 3–12.
35. *Varadi M., Adanyi N., Nagy G., Rezessy-Szabo J.* Studying the enzymatic reaction with amperometric detection for measuring maltose // *Biochimie.* – 1980. – 62. – N 8–9. – P. 587–593.
36. *Marconi E., Messia M. C., Palleschi G., Cubadda R.* A maltose biosensor for determining gelatinized starch in processed cereal foods // *Cereal*

- chemistry. – 2004. – 81. N 1. – P. 6–9.
37. *Odaci D., Telefoncu A., Suna T.* Maltose biosensing based on co-immobilization of α -glucosidase and pyranose oxidase // *Bioelectrochemistry*. – 2010. – 79. – P. 108–113.
 38. *Mahosenaho M., Caprio F., Micheli L., Sesay A., Palleschi G., Virtanen V.* A disposable biosensor for the determination of alpha-amylase in human saliva. *Microchim Acta*. – 2010. – 170. – P. 243–249.
 39. *Dzyadevych S. V.* Conductometric enzyme biosensors theory, technology and application // *Biopolymers and Cell*. – 2005. – 21, N 2. – P. 91–106.
 40. *Dzyadevych S. V., Soldatkin O. P.* Conductometric method of measurements in enzyme analysis // *Ukr. Biochem. J.* – 1994. – 66, N 4. – P. 30–42.
 41. *Marvin J. S., Schreiter E. R., Echevarria I. M., Looger L. L.* A genetically encoded, high-signal-to-noise maltose sensor // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2011. – 79. – N 11. – P. 3025 – 3036.
 42. *Kittivachra R., Sanguandeekul R., Sakulbumrungsil R., Phongphanphane P., Srisomboon J.* Determination of essential nutrients in raw milk // *Songklanakarini J. Sci. Technol.* – 2006. – 28. – P. 115–120.
 43. *Tkáč J., Sturdik E., Gemeiner P.* Novel glucose non-interference biosensor for lactose detection based on galactose oxidase–peroxidase with and without co-immobilised β -galactosidase // *Analyst*. – 2000. – 125. – N 7. – P. 1285–1289.
 44. *Eshkenazi I., Maltz E., Zion B., Rishpon J.* A three-cascaded-enzymes biosensor to determine lactose concentration in raw milk // *Journal of Dairy Science*. – 2000. – 83. – N 9. – P. 1939–1945.
 45. *Svitel J., Curilla O., Tkáč J.* Microbial cell-based biosensor for sensing glucose, sucrose or lactose // *Biotechnol Appl Biochem*. – 1998. – 27. – N 2. – P. 153–158.
 46. *Aoki K., Suzuki H., Ishimaru Y., Toyama S., Ikariyama Y., Iida T.* Thermophilic glucokinase-based sensors for the determination of various saccharides and glycosides // *Sensors and Actuators B*. – 2005. – 108. – N 1–2. – P. 727–732.
 47. *Tasca F., Ludwig R., Gorton L., Antiochia R.* Determination of lactose by a novel third generation biosensor based on a cellobiose dehydrogenase and aryl diazonium modified single wall carbon nanotubes electrode // *Sensors and Actuators B*. – 2013. – 177. – P. 64–69.
 48. *Dorokhovych V.* Fructosa imejet naybolshuju sladost' sredi zameniteley sakhara // *Khlibopekars'ka I kondyters'ka promyslovist' Ukrainy*. – 2011. – 1. – P. 38 – 39.
 49. *Barclay T., Ginic-Markovic M., Cooper P. D., Petrovsky N.* The chemistry and sources of fructose and their effect on its utility and health implications // *J. Excipients and Food Chem*. – 2012. – 3. – P. 67 – 81.
 50. *Guler A., Bakan A., Nisbet C., Yavuz O.* Determination of important biochemical properties of honey to discriminate pure and adulterated honey with sucrose (*Saccharum officinarum* L.) syrup // *Food Chemistry*. – 2007. – 105. – P. 1119 – 1125.
 51. *Lu J., Chen F., Xu H., Huang Y., Lu N.* Standardization and quality control for determination of fructose in seminal plasma // *Journal of Andrology*. – 2007. – 28. – N 2. – P. 207 – 213.
 52. *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*. – 1979. – 25. – N 10. – P. 1780 – 1782.
 53. *Held M., Schuhmann W., Jahreis K., Schmidt H.L.* Microbial biosensor array with transport mutants of *Escherichia coli* K12 for the simultaneous determination of mono- and disaccharides // *Biosens. Bioelectronics*. – 2002. – 17. – P. 1089–1094.
 54. *Tkac J., Vostiar I., Gemeiner P., Strudik E.* Stabilization of ferrocene leakage by physical retention in a cellulose acetate

- membrane. The fructose biosensor // *Bioelectrochemistry*. – 2002. – N 55. – P. 149–151.
55. Tkac J., Vostiar I., Gemeiner P., Strudik E., Gemeiner P., Mastihuba V., Annus J. Fructose biosensor based on D-fructose dehydrogenase immobilized on a ferrocene-embedded cellulose acetate membrane // *Analytica Chimica Acta*. – 2001. – N 439. – P. 39–46.
56. 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 and Bioelectronics*. – 1997. – 12. – N 12. – P. 1233–1243.
57. Ikeda T., Matsushita F., Senda M. Amperometric fructose sensor based on direct bioelectrocatalysis // *Biosensors and Bioelectronics*. – 1991. – 6. – P. 299–304.
58. 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.
59. Bassi A.S., Lee E., Zhu J.-X. Carbon paste mediated, amperometric, thin film biosensors for fructose monitoring in honey // *Food Research International*. – 1998. – 31. – N 2. – P. 19–127.
60. Garcia C.A.B., Neto G., Kubota L.T. New fructose biosensors utilizing a polypyrrole film and D-fructose 5-dehydrogenase immobilized by different processes // *Analytica Chimica Acta*. – 1998. – 374. – P. 201–208.
61. Campuzano S., Loaiza O., Pedrero M., Villena F., Pingarron J. An integrated bienzyme glucose oxidase–fructose dehydrogenase–tetrathiafulvalene–3–mercaptopropionic acid–gold electrode for the simultaneous determination of glucose and fructose // *Bioelectrochemistry*. – 2004. – N 63– P. 199–206.
62. 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. – V 13. – P. 911–923.
63. Kissinger P.T. Biosensors – a perspective // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2005. – 20. – P. 2512–2516.
64. Tsujimura S., Nishina A., Kamitaka Y., Kano K. Coulometric D-Fructose Biosensor Based on Direct Electron Transfer Using D-Fructose Dehydrogenase // *Anal. Chem.* – 2009. – 81. – P. – 9383–9387.
65. Antiochia R., Gorton L. A new osmium-polymer modified screen-printed graphene electrode for fructose detection // *Sensors and Actuators B*. – 2014. – 195. – P. 287–293.
66. Filipiak M., Fludra K., Gościmińska E. Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of oxygen electrode // *Biosensors and Bioelectronics*. – 1996. – 11. – N 4. – P. 355–364.
67. Vargas E., Gamella M., Campuzano S., Guzman-Vazquez de Prada A., Ruiz M.A., Reviejo A.J., Pingarron J.M. Development of an integrated electrochemical biosensor for sucrose and its implementation in a continuous flow system for the simultaneous monitoring of sucrose, fructose and glucose // *Talanta*. – 2013. – 105. – P. 93–100.
68. Lee S. J., Saleemuddin M., Scheper T., Lops H., Sahn H. A fluorometric fiber-optic biosensor for dual analysis of glucose and fructose using glucose-fructose-oxidoreductase isolated from *Zymomonas mobilis* // *Journal of Biotechnology*. – 1994. – 36. – P. 39–44.

Стаття надійшла до редакції 12.09.2014 р.