

# Применение ферментного сенсора на основе рН-чувствительных полевых транзисторов для определения концентрации глюкозы в соке картофеля

И. В. Скрышевская, Я. И. Корпан, А. П. Солдаткин

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

E-mail: i\_skry@yahoo.com

---

*Метод мониторинга качества картофеля, предложенный в данной работе, состоит в определении концентрации глюкозы в картофельном соке с помощью биосенсора на основе рН-чувствительных полевых транзисторов и иммобилизованной глюкозооксидазы. Концентрацию глюкозы в соке картофеля оценивали по методу стандартных добавлений, используя линейную область калибровочной кривой в диапазоне концентраций глюкозы от 0,2 до 2 мМ. Точность оценки проверяли, сравнивая сенсорный метод с колориметрическим определением глюкозы с помощью ферментного набора «Диаглюк» (Украина). Обнаружена хорошая корреляция между полученными данными.*

---

**Введение.** Важным показателем зрелости картофеля и соответствия коммерческой пригодности собранного урожая являются количественный состав и соотношение редуцирующих и нередуцирующих сахаров в клубнях. Кроме того, содержание глюкозы, фруктозы, сахарозы и крахмала в последних тесно связано с условиями культивирования и хранения картофеля и поэтому может являться индикатором различных повреждений клубней картофеля [1].

Основным свободным углеводом растения *Solanum tuberosum* и первым продуктом фотосинтеза, транспортируемым из листьев в подземные органы, является сахароза, которая не подвергается гидролизу в активно растущих клубнях благодаря наличию в них белкового ингибитора инвертазы. Высокое содержание нередуцирующей сахарозы и редуцирующих гексоз (глюкозы больше, чем фруктозы) постепенно снижается в процессе созревания клубней: для большинства культивируемых сортов картофеля уровень сахарозы менее 2,8 г на 1 кг сырой массы считается химическим показателем зрелости

[1]. Однако при хранении собранного урожая происходит активация инвертазы в клетках клубней и при высоком содержании в них сахарозы это приводит к значительному возрастанию концентрации свободных гексоз.

Данное явление отрицательно сказывается на качестве продуктов переработки клубней, особенно чипсов и жареного картофеля, поскольку высокая температура ускоряет неферментативную реакцию меланоидинообразования (потемнения тканей), протекающую между аминокислотами и восстанавливающими углеводами в присутствии кислорода. Поэтому для коммерческих сортов *S. tuberosum*, используемых в производстве чипсов, картофеля фри и картофельных хлопьев, рекомендуется минимальное содержание сахарозы (менее 3 г на 1 кг сырой массы) и глюкозы (в пределах 1,8–2,1 г на 1 кг сырой массы) [1–3].

Кроме того, при низких температурах в клубнях крахмал конвертируется в олиго- и мономеры с антифризными свойствами, предохраняющими клетки от разрушения. В приобретении клубнем сладкого вкуса, возможно, ключевую роль играет инвертазная активность. Возрастание concentra-

ции моносахаридов является одним из показателей начала ростовых процессов в «глазках» (в условиях высокой влажности и освещенности). Низкое содержание кислорода в помещении также способно провоцировать гидролиз полисахаридов в тканях клубней, т. е. повышение концентрации глюкозы может свидетельствовать о длительном неправильном хранении картофеля.

Недавно для увеличения резистентности картофеля к заболеваниям было предложено вводить в растение ген глюкозооксидазы (ГОД), которая, окисляя свободную глюкозу в клетке, генерирует токсичный для микроорганизмов пероксид водорода [4]. Кроме того, глюкоза у пасленовых является одним из субстратов соланидин-UDP-глюкозо-глицозилтрансферазы (СГТ) — одного из ключевых ферментов биосинтеза гликоалкалоидов — стероидных гликозидов, токсичных как для вредителей, так и для животных и человека [5]. Можно предположить, что создание в будущем картофеля с комбинацией генов СГТ и ГОД позволило бы снизить в нем как содержание свободной глюкозы, так и гликоалкалоидов, т. е. повысить стойкость к заболеваниям и вкусовые качества урожая и, следовательно, его коммерческую ценность.

Таким образом, мониторинг углеводов в соке картофеля является необходимым для контроля зрелости собранного урожая, а также его качества после хранения в определенных условиях. На сегодняшний день существует множество методов измерения глюкозы как в биологических жидкостях, так и в продуктах питания, например, овощных и фруктовых соках, однако даже наиболее современные из них требуют существенных затрат на оборудование, реактивы и часто являются непригодными для массового мониторинга глюкозы. Предложенный в данной работе метод определения глюкозы в соке картофеля с помощью потенциометрического ферментного сенсора является точным, относительно нетрудоемким и дешевым.

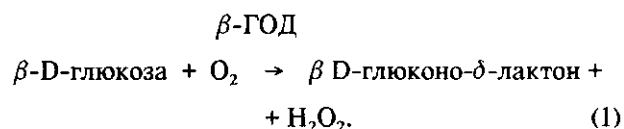
**Материалы и методы.** В работе использовали следующие реактивы:  $\beta$ -глюкозооксидазу ( $\beta$ -ГОД) (КФ 1.1.3.4.) с активностью 130 ед/мг, полученную от «Диагностикум» (Украина), бычий сывороточный альбумин (БСА) — от «Sigma-Aldrich Chemie GmbH» (Германия), 25 %-й водный раствор глутарового альдегида (ГА) — от «Serva» (Германия), остальные реактивы (отечественного и импортного производства) соответствовали квалификации «ос. ч.» и «х. ч.».

**Создание биосенсора.** рН-чувствительные полевые транзисторы (рН-ПТ) произведены заводом «Микроприбор» (Киев). Сенсорный датчик представляет собой кремниевый кристалл, на котором

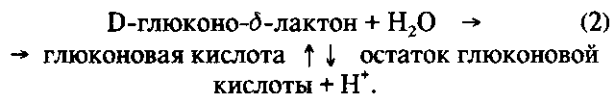
расположены два одинаковых преобразователя: поверх подзатворного диэлектрика (термически выращенный  $\text{SiO}_2$ ) нанесен слой  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , чувствительного к изменению концентрации протонов. На поверхности затворов пары рН-ПТ капельным методом сформированы биомембраны: чувствительная (5 % (m/v)  $\beta$ -ГОД + 5 % (m/v) БСА) и референтная (10 % (m/v) БСА) Растворы для мембран готовили в 20 мМ фосфатном буфере ( $\text{NaOH} + \text{KH}_2\text{PO}_4$ ), рН 7,5, с добавлением глицерина до конечной концентрации 10 % (v/v).

**Иммобилизацию фермента** на поверхности преобразователя проводили в насыщенных парах глутарового альдегида в течение 25 мин, после чего датчик со сформированными биомембранами опускали на 20 мин в фосфатный буфер для отмывки от избытка ГА и стабилизации базового сигнала [6].

**Для проведения измерений** сенсор погружали в измерительную ячейку объемом 2 мл, заполненную 10 мМ фосфатным буфером, рН 7,4. Изменения рН раствора вблизи поверхности чувствительной области сенсора, модулирующие потенциал затвора полевого транзистора, происходили в результате ферментативной реакции окисления глюкозы, протекающей в слое иммобилизованной глюкозооксидазы:



Известно, что глюконолактон ( $\text{pK}_a = 3,8$ ) в среде фосфатного буфера (рН 7,4) подвергается спонтанному гидролизу до глюконовой кислоты с образованием протонов [2], которые, взаимодействуя с рН-чувствительным слоем преобразователя, обуславливают сигнал потенциометрического сенсора:



Установка для регистрации дифференциального сигнала между рабочим и референтным рН-ПТ датчика, используемая в данной работе, ранее описана в литературе [7]. Применение дифференциальной схемы измерений нивелирует помехи, вносимые колебаниями температуры и света или электрическими наводками, что обеспечивает высокую точность анализа [8].

**Получение сока для исследований.** Сок, выжатый из очищенного покупного картофеля, перед анализом центрифугировали в течение 2 мин при 4000 об/мин.

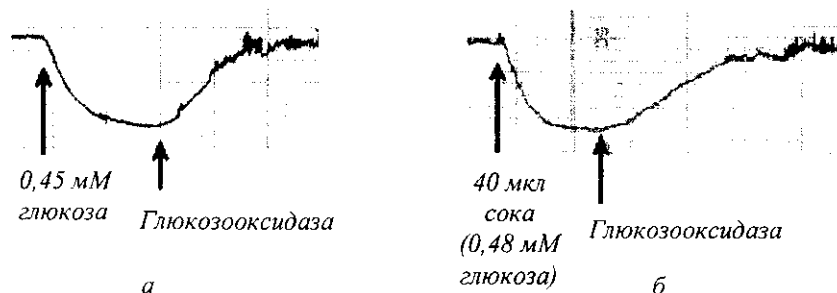


Рис. 1. Типичные отклики биосенсора на добавление чистой глюкозы (а) и сока картофеля (б) в ячейку, содержащую 10 мМ фосфатный буфер, рН 7,4

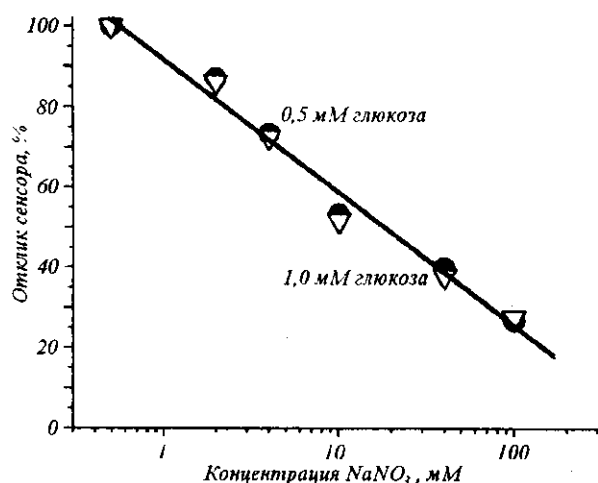


Рис. 2. Влияние нитрата натрия на отклик потенциметрического биосенсора при рН 7,4. За 100 % принят максимальный отклик сенсора на данную концентрацию субстрата

Сравнительные измерения глюкозы в соке картофеля осуществляли колориметрически с применением аналитического набора «Диаглюк» (завод бактериальных препаратов, Украина).

**Результаты и обсуждение.** Для начала сравнивали отклики биосенсора на внесение в измерительную ячейку глюкозы и сока картофеля. На рис. 1 приведен типичный отклик сенсора на глюкозу в 10 мМ фосфатном буферном растворе, рН 7,4 (а), и в смеси буфера с соком (б). Можно убедиться, что внесение глюкозы и сока приводило к формированию аналогичного отклика. В обоих случаях после последующего добавления в измерительную ячейку 6 мкл 5 %-го (м/в) раствора глюкозооксидазы в 10 мМ фосфатном буфере сигнал датчика падает до уровня базисной линии. В ячейку с буфером также вносили обработанный глюкозооксидазой сок, при этом сенсорного отклика не наблюдалось.

Из приведенных данных видно, что другие ингредиенты сока не влияют на время отклика, его форму и величину (в отличие от сыворотки крови

[9]). Таким образом, в случае анализа глюкозы в картофельном соке, видимо, нет необходимости в защите ферментной мембраны нанесением дополнительных слоев типа Nafion, которые нужны при анализе в биологических жидкостях, например, крови или сыворотке крови, так как существенно снижают влияние буферной емкости среды на сигнал сенсора и подавляют неспецифический сигнал [6, 9].

Особенности реакции (1), а именно: образование перекиси водорода и кислорода, генерация протонов и изменение проводимости среды, позволяют использовать разные типы сенсорных преобразователей для определения глюкозы, в частности, кондуктометрические, амперометрические и потенциметрические [7, 9].

Но при выборе оптимального типа трансдюсера необходимо учитывать тот факт, что на точность анализа может существенно влиять присутствие нитратов в образце. Эти анионы затрудняют амперометрическое определение глюкозы, поскольку параллельно с током восстановления кислорода возникает интерферирующий ток электродного восстановления нитратов [10]. Известно, что при поздних сроках уборки содержание нитратов в клубнях снижается на 50–60 % и составляет обычно менее 250 мг/кг, или примерно 4 мМ [11]. Более высокие концентрации нитратов способны обратимо ингибировать глюкозооксидазу при рН 4 [12].

На рис. 2 показано, что при наличии в буферном растворе (рН 7,4) нитрата натрия сигнал биосенсора снижается (независимо от концентрации глюкозы) до 20 % от начальной величины при концентрации нитрата натрия 100 мМ. Но это всего лишь эффект ионной силы, который был обнаружен ранее для глюкозного потенциметрического биосенсора [6]. Более того, максимально возможная концентрация нитратов в картофеле не может превышать 5–10 мМ [11], что при 50-кратном и более высоком разведении образца составляет всего лишь 0,1–0,2 мМ. Как видно из рис. 2, такие концентрации не влияют на сигнал

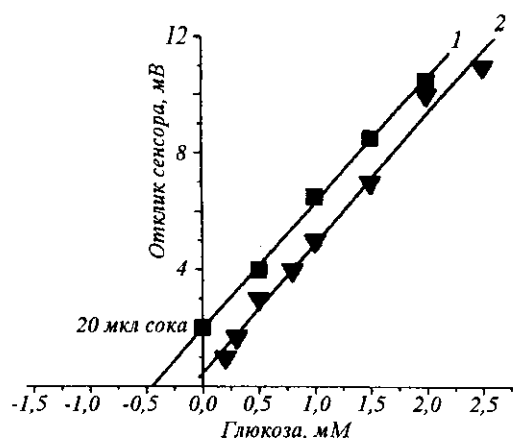


Рис. 3. Калибровочные кривые, полученные при измерении глюкозы биосенсорным методом: 1 — добавление 20-мкл аликвоты сока и последующее добавление стандартных концентраций глюкозы в рабочий 10 мМ фосфатный буфер, pH 7,4 ( $y = 4,3x + 2$ ,  $R = 0,9992$ ); 2 — внесение только стандартных концентраций глюкозы ( $y = 4,43x + 0,46$ ,  $R = 0,9947$ )

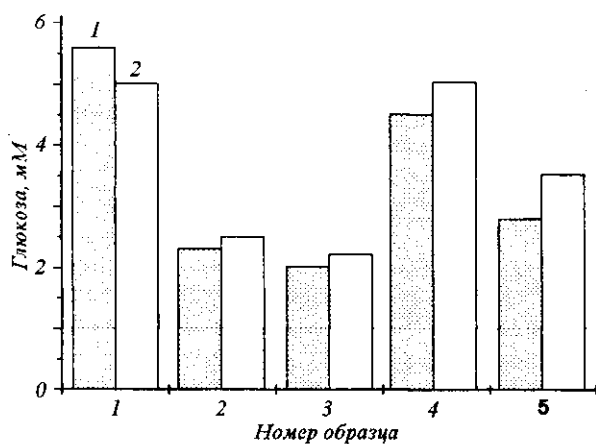


Рис. 4. Сравнительные результаты по определению содержания глюкозы в соке шести разных сортов клубней молодого картофеля: 1 — с помощью набора «Диаглюк»; 2 — с использованием биосенсора

сенсора и соответственно не меняют точности определения глюкозы в картофеле. Точность же определения глюкозы в картофеле амперометрическим глюкозным сенсором может сильно зависеть от влияния таких концентраций электроактивных нитратов. Поэтому был использован биосенсор с потенциометрическим методом детекции.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сигнал биосенсора сильно зависит от ионной силы исследуемого образца, но в основном в области больших концентраций (десятки миллимолей на литр), а нитрат натрия, скорее всего, не

влияет на активность иммобилизованной глюкозооксидазы при pH 7,4. Возможно, что анионы нитрата (подобно  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{F}^-$ ) конкурентно ингибируют ГОД только при низких уровнях pH [12]. Поэтому при внесении в ячейку с 2 мл 10 мМ буфера (pH 7,4) 20 мкл сока, содержащего 4 мМ нитраты (100-кратное разведение, конечная концентрация глюкозы 0,04 мМ), влияния нитратов на отклик биосенсора не наблюдается, в чем и заключается преимущество потенциометрической детекции глюкозы в картофеле.

По калибровочной кривой, полученной в результате внесения в измерительную ячейку определенных аликвот исходного раствора глюкозы (0,2 М), установлена зависимость отклика биосенсорного датчика от концентрации глюкозы и оценена линейная зависимость, имеющая место в диапазоне концентраций глюкозы 0—2 мМ (рис. 3, кривая 2).

Концентрацию глюкозы в образцах сока оценивали, используя метод стандартных добавлений: в ячейку с 10 мМ фосфатным буфером, pH 7,4, добавляли аликвоту сока (20, 40 или 100 мкл, получая разведение соответственно 1:100, 1:50 или 1:20), регистрировали сигнал и добавляли известные стандартные концентрации глюкозы. Таким образом строили калибровочную кривую и, экстраполируя ее начальную часть (рис. 3, кривая 1) на ось абсцисс, получали содержание глюкозы в образце. Например, концентрация глюкозы в свежесжатом соке зрелого (зимнего) картофеля составляла  $25 \pm 3$  мМ, а в соке того же картофеля, но после его хранения в морозильной камере при  $-18^\circ\text{C}$  в течение 4,5 месяцев —  $46 \pm 2$  мМ (средние данные из пяти измерений). В последнем случае увеличение содержания глюкозы почти в два раза можно объяснить низкотемпературным разрушением углеводных полимеров в клубнях.

Сравнительные результаты по измерению глюкозы в соке покупного молодого (летнего) картофеля разных сортов, полученные двумя различными методами (биосенсорным и колориметрическим), представлены на рис. 4 (каждое измерение повторяли как минимум трижды). Как видно из этого рисунка, корреляция между сопоставляемыми данными достаточно хорошая.

**Выводы.** Таким образом, показана возможность применения ферментного сенсора на основе pH-чувствительных полевых транзисторов и иммобилизованной глюкозооксидазы для определения глюкозы в соке картофеля. Сравнение результатов определения глюкозы в соке картофеля биосенсорным и стандартным колориметрическим методом показало их достаточно высокую корреляцию.

Авторы выражают благодарность Национальной Академии наук Украины за финансовую поддержку данных исследований (тема 2.2.4.18.)

*I. V. Skryshevska, Y. I. Korpan, A. P. Soldatkin*

Application of enzyme biosensor base on pH-sensitive field transistors for determination of glucose concentration in potato juice

Summary

*A method for potato quality monitoring based on the determination of glucose concentration in potato juice using pH-sensitive field effect transistors with immobilized glucose oxidase has been proposed. Glucose concentration in potato juice was determined by a method of standard additions using the linear part of a calibration curve within dynamic range of 0.2–2 mM glucose concentration. To estimate the accuracy of glucose detection by the biosensor proposed, the measurements were also performed by a colorimetric method («Diagluс» enzymatic kit, Ukraine). A good correlation between these techniques is obtained.*

*I. В. Скришевська, Я. І. Корпан, О. П. Солдаткін*

Застосування ферментного сенсора на основі pH-чутливих польових транзисторів для визначення концентрації глюкози у картопляному соку

Резюме

*Метод моніторингу якості картоплі, запропонований в даній роботі, полягає у визначенні концентрації глюкози в картопляному соку за допомогою біосенсора на основі pH-чутливих польових транзисторів та іммобілізованої глюкозооксидази. Концентрацію глюкози в соку картоплі оцінювали за методом стандартних добавок, використовуючи лінійну область калібрувальної кривої у діапазоні концентрацій глюкози від 0,2 до 2 мМ. Точність оцінки перевіряли, порівнюючи сенсорний метод з колориметричним визначенням глюкози за допомогою ферментного набору «Діаглюк» (Україна). Між отриманими даними спостерігалася добра кореляція.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pritchard M. Relationships of sugars to color of processed potatoes // Potato Facts Bull.—New York: Manitoba Agricult. and Food. publ., 1993.—P. 4.

2. Tai G., Xiong X.-Y. Selection for low glucose content in potato breeding populations // Northeast Potato Technology Forum materials.—Seabrook, 2001.—P. 118.

3. Sowokinos J. Choices for potatoes that chip directly from 42 F without reconditioning // Valley Potato Grower.—1999.—64, N 114.—P. 14—17.

4. Wu G., Shortt B., Lawrence E., Levine E., Fitzsimmons K., Shad D. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants // The Plant Cell.—1995.—7.—P. 1357—1368.

5. Pat. USA 5, 959, 180. DNA sequences from potato encoding solanidine UDP-glucose glucosyltransferase and use to reduce glycoalkaloids in solanaceous plants / Moehs C. P., Allen P., Rockhold E., Stapleton A., Friedman M., Belknap W. // Publ. 1999.

6. Soldatkin A. P., Ef'skaya A. V., Shul'ga A. A., Netchiporouk L. I., Nyamsi Hendji A. M., Jaffrezic-Renault N., Martelet C. Glucose-sensitive field-effect transistor with additional Nafion membrane // Anal. chim. acta.—1993.—283.—P. 695—701.

7. Volotovskiy V. V., Patskovskiy S. V. Device for measuring of gate potential of ion-sensitive field effect transistor // Devices Exp. Tech.—1996.—3.—P. 168.

8. Солдаткин А. П., Бубряк О. А., Стародуб Н. Ф., Ельская А. В., Сануровский А. К., Шульга А. А., Стриха В. И. Уреазный биосенсор на полевом транзисторе. Особенности конструкции и характеристики работы в модельных условиях // Электрохимия.—1993.—29, № 3.—С. 315—320.

9. Dzyadevich S., Korpan Ya., Arkhipova V., Alesina M., Martelet C., Ef'skaya A., Soldatkin A. Application of enzyme field effect transistors for determination of glucose concentrations in blood serum // Biosensors and Bioelectronics.—1999.—14.—P. 283—287.

10. Kim D., Goldberg I., Judy J. A micromashed amperometric nitrate sensor // Proc. Annu. Res. Rev. of UCLA Electrical Engineering Department.—Los-Angeles, 2003.—P. 19—25.

11. Третьяков Н. Н., Кошкин Е. И., Макрушин Н. М. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений.—М.: Колос, 2000.—640 с.

12. Przybyt M. Influence of anions on glucose electrode response: application to extending concentration range // Biosensors and Bioelectronics.—1998.—13.—P. 471—477.

УДК 543.13:577.15.004.14  
Надійшла до редакції 02.06.03