

# Методика визначення етанолу у вині ферментним амперометричним біосенсором

Т. Б. Горюшкіна<sup>1,2</sup>, А. П. Орлова<sup>1,2</sup>, Г. М. Верик<sup>3</sup>,  
О. П. Солдаткін<sup>1</sup>, С. В. Дзядевич<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка  
Вул. Володимирська, 64, Київ, Україна, 01003

<sup>3</sup>Інститут винограду та вина «Магарач»  
Вул. Кірова, 31, Ялта, Україна, 98600

tatiana\_goryushkina@yahoo.com

---

**Мета.** Розробка методики визначення етанолу у вині ферментним амперометричним біосенсором. **Методи.** Використано ферментний амперометричний біосенсорний метод аналізу етанолу. **Результати.** Проведено порівняльний аналіз ефективності застосування двох методів іммобілізації алкогольоксидази (АО) при розробці амперометричного біосенсора для аналізу етанолу у вині. Обрано метод іммобілізації ферменту у парах глутарового альдегіду, за використання якого іммобілізована АО демонструє кращі робочі характеристики. Досліджено селективність, операційну стабільність та стабільність при зберіганні створеного біосенсора, встановлено рН-оптимум його роботи. Відпрацьовано методику визначення етанолу у вині за допомогою амперометричного біосенсора на основі платинового електрода SensLab та АО. Із застосуванням розробленого високостабільного біосенсора проаналізовано концентрацію етанолу у зразках вина. Показано високу кореляцію отриманих результатів із даними методу денситометрії дистилляту. **Висновки.** Запропоновану методику аналізу етанолу можна в подальшому використовувати у виноробстві.

*Ключові слова:* амперометричний біосенсор, алкогольоксидаза, етанол, вино, сусло.

---

**Вступ.** Етанол є основним продуктом спиртового бродіння, який утворюється дріжджами при збродженні цукрів виноградного сусла. Фактичний вихід етанолу з 1 г цукру складає 0,58–0,60 мл, що залежить від стану та раси дріжджів. У сухих столових винах спирту мало і він є на 100 % ендогенного походження. У десертних винах етанолу набагато більше, причому 80–90 % його додається екзогенно [1].

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, 2009

Контроль вмісту етанолу у винах є обов'язковим на всіх стадіях виноробства через особливості його фізіологічної дії на організм людини [2]. Саме етанол обумовлює токсичні властивості алкогольних напоїв, у високих концентраціях спричиняючи алкогольне отруєння [1, 3]. Тому визначення розмірів безпечного споживання вин та інших алкогольних напоїв ґрунтується на оцінці кількості етанолу, що потрапляє з ними до організму. Крім того, підвищення концентрації етанолу у суслі негативно впливає на ріст та розвиток дріжджових культур під

час ферментації вина [1]. Відповідно з економічної точки зору постійне визначення вмісту етанолу (бажано разом з іншими ключовими компонентами) необхідно на всіх стадіях виноробства для контролю, оптимізації та попередження порушень процесу бродіння [1, 4].

Сусло під час ферментації представляє собою трифазну систему, яку досить важко аналізувати. Це складна суміш цукрів, органічних кислот, білків, амінокислот, пігментів, танінів, ароматичних речовин, вітамінів, ферментів і мінеральних солей, у якій, крім того, можуть знаходитися тверді частинки винограду, мікроорганізми та гази [1, 5]. Вино також є комплексом з більш ніж 500 різноманітних органічних і неорганічних сполук: спиртів, альдегідів, кетонів, ефірів, вуглеводів, кислот, фенольних, азотистих, мінеральних і біологічно активних речовин [1]. Тому при аналізі вин і сусел потрібно враховувати такі ключові аспекти, як різноманітність компонентів та неоднорідність досліджуваного середовища. Відповідно метод, призначений для аналізу певного компонента вина, повинен ґрунтуватися на реакціях або принципах визначення, максимально селективних до цільового аналіту. До того ж, оскільки вміст речовин може суттєво варіювати залежно від типу вина, важливо забезпечити вимірювання цільового аналіту у широких межах концентрацій та враховувати наявність у середовищі інтерферуючих речовин, кількість і склад яких також є різним у різних типах вин та виноматеріалів [6].

Традиційно для визначення етанолу у виноробстві використовують газову хроматографію, а також відгонку спирту з наступним денситометричним або рефрактометричним аналізом дистилату [1, 2]. Такі підходи можуть бути достовірними, проте у разі методу відгонки специфічність визначення етанолу часто є низькою через наявність у вині інших летких сполук, які відганяються разом із спиртом [2]. Крім того, класичні методи аналізу етанолу вимагають значних витрат часу, досвідчених операторів, спеціальної підготовки проби, дорогого та/або громіздкого обладнання [1]. Причому жоден з подібних приладів не є мобільним і здатним до автоматизації та адаптації для потреб і фінансових умов невеликих виноробних підпри-

ємств, зацікавлених у використанні дешевих і надійних приладів [7, 8].

У цьому сенсі ферментні біосенсиори є привабливою альтернативою традиційним аналітичним методам та одним із найперспективніших способів розв'язання проблем, пов'язаних із швидким, дешевим і достовірним визначенням етанолу у таких комплексних сумішах, як сусло та вино [4]. Тому не дивно, що останніми роками біосенсиори набувають все ширшого застосування для аналізу якості продуктів у харчовій промисловості, у тому числі і виноробстві [9].

Робота переважної більшості ферментних біосенсорів, створених для визначення компонентів вина, базується на амперометричному методі детекції. Це обумовлене, перш за все, незалежністю відгуку амперометричних біосенсорів від буферної ємності та іонної сили розчину, у якому проводять вимірювання [4], що, безперечно, є великою перевагою при проведенні аналізів реальних рідин.

При розробці амперометричного біосенсора для аналізу етанолу у вині найдоцільніше використовувати фермент алкогольоксидазу (АО), яку продукують метилотрофні дріжджі родів *Hansenula*, *Pichia*, *Candida*. АО – олігомерний білок, що складається з восьми ідентичних субодиниць, організованих у квазікубічну структуру, кожна з яких містить міцно зв'язаний кофактор ФАД [10]. Відповідно процес визначення не потребує екзогенного внесення кофактора, що значно спрощує аналітичну процедуру [4]. Створені на основі іммобілізованої АО амперометричні біосенсиори мають широкий динамічний діапазон роботи у межах концентрації субстрату від 0,1 до 30 мМ [10], що добре задовольняє потреби аналізу вин та виноматеріалів з дуже істотним варіюванням вмісту етанолу.

Проте багато з ферментних амперометричних біосенсорів на основі іммобілізованої АО, розроблених на сьогодні, демонструють деякі недоліки у порівнянні з традиційними методами аналізу етанолу у вині. Найістотнішими проблемами, що обмежують використання біосенсорів при аналізі вина та сусла, є низька стабільність і недостатня селективність подібних приладів [4].

Відомо, що ферменти, вилучені з природного мікрооточення, схильні до швидкої втрати актив-

ності, що лімітує час використання біосенсора [11]. Літературні дані свідчать, що алкогольоксидаза належить до ферментів з невисокою стабільністю: вона демонструє 50 % від вихідної активності через 16–18 діб після іммобілізації [12, 13]. В інших дослідженнях показано, що рівень сигналу біосенсорів на основі АО через місяць зберігання становив 60 [14] і 30 % [15, 16] від початкового. Зазначимо, що в даних роботах для іммобілізації АО на поверхню платинових електродів застосовано електрохімічне нанесення в осмій-вмісних [13] та акрилових полімерах [14], а також іммобілізація ферменту у полікарбамоїлсульфонатний гідрогель [12] та іммобілізація АО в глутаровому альдегіді на вуглецеві електроди [15, 16].

Тим часом встановлено, що стабільність ферменту залежить, крім інших чинників, і від методу його іммобілізації на поверхню електрода, впливу на його функціонування компонентів чутливої мембрани та вибору матеріалу електрода біосенсора [4]. Це добре ілюструє робота [17], авторам якої вдалося досягти збереження майже 100 % активності біосенсора на основі АО після проведення 90 вимірювань завдяки застосуванню золотих електродів та перехресного зшивання ферменту з бичачим сироватковим альбуміном за допомогою глутарового альдегіду.

Низька селективність біосенсора до субстрату може спричинитися чутливістю ферментативної мембрани та/або поверхні амперометричного електрода до інтерферуючих речовин вина, що окиснюються на електроді. Недостовірність результатів аналізу вин і виноматеріалів за допомогою біосенсорів може бути викликана також і тим, що певні компоненти вина здатні виступати активаторами, інгібіторами або навіть другими субстратами іммобілізованого ферменту [19].

Результати дослідження селективності біосенсорів, розроблених на основі іммобілізованої АО, свідчать, що такі датчики часто виявляються чутливими до лактату [16, 18], ацетату [18] і особливо до метанолу [17, 18] та аскорбінової кислоти [16, 18]. При цьому поява неспецифічного відгуку на аскорбінову кислоту обумовлена її електрохімічним окисненням на електроді, яке має місце при високих робочих потенціалах. Способом зменшення

цього сигналу є застосування у роботі нижчих потенціалів, щоправда, від цього може страждати чутливість біосенсора [20]. Окиснення ж подібного за будовою до етанолу одноланцюгового аліфатичного спирту метанолу звичайно каталізується самою АО, як і неспецифічне окиснення лактату та ацетату [18]. Уникнути впливу згаданих речовин на роботу біосенсора на основі АО можна за допомогою максимального великого розведення проб вина при аналізі, через що постає проблема вибору оптимального ступеня розведення, який відповідав би чутливості конкретного біосенсора до субстрату і був придатним як для міцних, так і сухих вин з нижчим вмістом етанолу.

Тому дослідження та оптимізація стабільності й селективності ферментного біосенсора, а також відпрацювання методики аналізу вина за його допомогою є важливими стадіями, що передують застосуванню таких приладів у виноробстві, що й було метою даної роботи.

**Матеріали і методи.** *Матеріали.* У роботі використано фермент алкогольоксидазу з *Hansenula sp.* виробництва фірми «Sigma-Aldrich» (Велика Британія) з активністю 1,6 од. акт/мг.

Для електрохімічної полімеризації ферменту використовували мономер 3,4-етилendioкситіофен (ЕДТ) виробництва фірми Baytron M (ФРН) та поліетиленгліколь 1450 фірми «Sigma» (Швейцарія). Для іммобілізації ферменту також використано бичачий сироватковий альбумін (БСА) виробництва фірми «Sigma-Aldrich Chimie S. a. r. l.» (Франція) та глутаровий альдегід від фірми «Fluka» (Швейцарія).

У роботі застосовано реагенти  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaCl}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{HCl}$ , глюкозу та L-аскорбінову кислоту виробництва фірми «Sigma-Aldrich Chimie S. a. r. l.», пероксид водню від фірми «Фаргомед» (Україна), лактат натрію від фірми «Sigma» (США), етанол фірми «Fluka» (ФРН) та гліцерин виробництва України. Усі реактиви як вітчизняного, так і імпортного походження відповідали кваліфікації «ос. ч» і «х. ч».

*Вимірювання.* Усі електрохімічні експерименти виконували за допомогою традиційної триелектродної системи, в якій друкований електрод SensLab («SensLab GmbH», ФРН) об'єднав у собі всі три

електроди: платиновий робочий, допоміжний та електрод порівняння. Нашими попередніми дослідженнями [20] показано, що чисті електроди SensLab без будь-якої ферментної мембрани не дають відгуку на вино, сусло та їхні основні компоненти і тому їх можна ефективно застосовувати при розробці біосенсорів для аналізів вина та виноматеріалів.

Платинові друковані електроди SensLab досліджували на відтворюваність та працездатність у діапазоні потенціалу від 0 до +600 мВ (швидкість розгортання потенціалу 20 мВ/с). Циклічну вольтамперометрію виконано на потенціостаті PalmSens (Palm Instruments BV, Нідерланди).

Амперометричне вимірювання при постійному потенціалі +200 мВ проводили в електрохімічній комірці об'ємом 5 мл за допомогою потенціостата PalmSens.

*Імобілізація алкогольоксидази методом електрохімічної полімеризації у полі-3,4-етилендіокситіофені (ПЕДТ).* Електрохімічна полімеризація невеликих мономерів – один із найновіших підходів до формування мембран на поверхні електродів, що вже знайшов успішне застосування у біосенсоріці. Зазначений метод дозволяє обирати та підтримувати розмір, форму й товщину плівки, а також проводити чіткий контроль за процесом осадження [20]. Завдяки напівпроникності для пероксиду водню та непроникності для інших сполук електрополімеризовані плівки виступають у ролі селективного бар'єра, що відсікає інтерферуючий вплив електроактивних речовин, таких як аскорбінова кислота, часто присутня у суслі, вині та інших реальних рідинах [10, 21].

Процес імобілізації ферментів методом електрохімічної полімеризації у ПЕДТ детально описаний у роботі [20]. Для електрохімічної полімеризації використовували суміш компонентів, приготовлених у 20 мМ фосфатному буфері з рН 6,2, яка складалася з 10 мМ ЕДТ, 1 мМ поліетиленгліколю та 30 %-го розчину АО.

Електрополімеризацію ЕДТ здійснювали, прикладаючи потенціал від +0,2 до +1,5 В зі швидкістю 0,1 В/с протягом 15 циклів. Електрохімічний синтез ПЕДТ контролювали із застосуванням циклічної вольтамперометрії.

*Імобілізація алкогольоксидази у парах глутарового альдегіду.* Глутаровий альдегід (ГА) – це поліфункціональний агент, що формує ковалентні зв'язки між біокаталітичними частками або білками. Тому імобілізацію ферментів за допомогою ГА часто використовують при розробці біосенсорів. Застосовуючи даний метод імобілізації, можна отримати тривимірну матрицю, у якій фермент тісно зв'язаний з матеріалом електрода, що забезпечує як утримання біомолекули в мембрані, так і ефективний електричний зв'язок між нею та поверхнею електрода [22].

Для утворення біоселективних мембран готували суміш 30 %-го розчину АО та 5 %-го БСА (1:1) у 10 мМ фосфатному буфері, рН 7,2. Суміш АО–БСА наносили на робочу поверхню електрода. Для полімеризації мембран датчики вміщували в атмосферу насичених парів ГА на 10 хв, після чого підсушували на повітрі.

*Визначення етанолу у модельних розчинах.* Вимірювання проводили при кімнатній температурі у відкритому об'ємі з інтенсивним перемішуванням. Як робочий буфер використовували розчин 20 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  з рН 7,2. Фоновим електrolітом слугував NaCl (10–200 мМ).

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

*Визначення етанолу у вині та суслі.* Аналіз етанолу проводили у 23 зразках вин різного типу, а також у двох зразках білих і червоних виноматеріалів, вироблених за умов мікровиноробства в Інституті винограду та вина «Магарач».

Рівень етанолу у вині та суслі за допомогою амперометричного біосенсора вимірювали у 20 мМ фосфатному буферному розчині, рН 7,2, при кімнатній температурі у відкритому об'ємі з інтенсивним перемішуванням.

Концентрацію етанолу визначали за допомогою методу стандартних додавань. Для проведення аналізу пробу розводили у 2000 разів. Після отримання кожного відгуку сенсор відмивали буферним розчином до стабілізації базового сигналу. Контроль вмісту етанолу у суслі та в готових винах

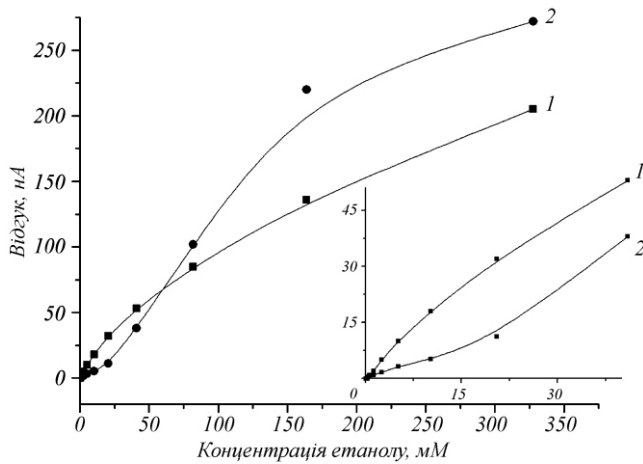


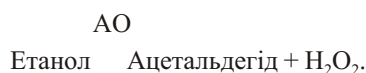
Рис. 1. Калібрувальні криві лабораторних прототипів амперометричних біосенсорів на основі алкогольоксидази, іммобілізованої в парах глутарового альдегіду в БСА-вмісній мембрані (1) та методом електрохімічної полімеризації у полі-3,4-етилендіокситіофені (2). Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, при потенціалі +200 мВ відносно електрода порівняння

здійснювали за допомогою методу дистиляції спирту з подальшим денситометричним визначенням.

*Дослідження операційної стабільності та стабільності біосенсорів при зберіганні.* Для визначення операційної стабільності біосенсорів та відтворюваності їхніх відгуків в електрохімічну комірку періодично вносили аліквоти субстрату (20 мМ) та проби вина «Портвейн червоний» (20 мкл) і реєстрували зміну сигналу біосенсора протягом 8 год неперервної роботи.

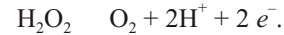
Електроди з іммобілізованою у парах ГА та в ПЕДТ АО зберігали в сухому стані за температури 4 С. У ході аналізу стабільності біосенсорів при зберіганні досліджували зміну величини їхнього відгуку на субстрат у концентрації 20 мМ.

**Результати і обговорення.** Робота амперометричних біосенсорів, розроблених на основі АО, базується на такій ферментативній реакції:



Процес ферментативного перетворення етанолу супроводжується виділенням електрохімічно активної речовини – пероксиду водню, що окис-

нюється з утворенням електронів, які реєструються амперометричним перетворювачем:



Метою першого етапу дослідження був вибір найефективнішого методу іммобілізації АО на поверхню електрода SensLab при розробці біосенсора для аналізу етанолу у вині. У роботі досліджували дві технологічно різні методики іммобілізації АО: електрохімічна полімеризація у ПЕДТ та іммобілізація у парах глутарового альдегіду в БСА-вмісній мембрані. Калібрувальні криві біосенсорів на основі АО, іммобілізованої даними методами, представлено на рис. 1. Як видно з цього рисунка, АО, іммобілізована у ПЕДТ, демонструє вищий ліміт детекції етанолу та меншу величину корисного сигналу на початковій ділянці калібрувальної кривої у порівнянні з АО у ГА. Динамічний діапазон роботи біосенсорів, створених із застосуванням різних методів іммобілізації АО, є практично однаковим: 0,32–41 мМ етанол для АО в ГА та 0,64–41 мМ етанол для АО в ПЕДТ.

При дослідженні селективності розроблених біосенсорів отримано їхні відгуки на основні компоненти вина, наявність яких потенційно може впливати на роботу етанольних датчиків, а саме – на гліцерол, глюкозу, лактат і аскорбінову кислоту. Як видно з рис. 2, а, б, метод іммобілізації АО суттєво не впливає на селективність біосенсора. Датчики на основі АО в ГА та в ПЕДТ практично не реагують на глюкозу і лактат, дають незначні негативні відгуки на аскорбінову кислоту та позитивні – на гліцерол, значення яких порівнянні з величиною відгуку на етанол.

Зазначимо, що при розробці біосенсора для аналізу етанолу у виноробстві абсолютна нечутливість датчика до гліцеролу не є обов'язковою, адже концентрація цільового аналіту у винах в десятки разів перевищує концентрацію гліцеролу, і подібна недостатня селективність біосенсора легко нівелюється при розведенні проб.

Аналіз операційної стабільності та відтворюваності відгуків розроблених біосенсорів показав, що АО в ПЕДТ після 8 год безперервної роботи демонструє 160 % від вихідної активності, АО в ГА –

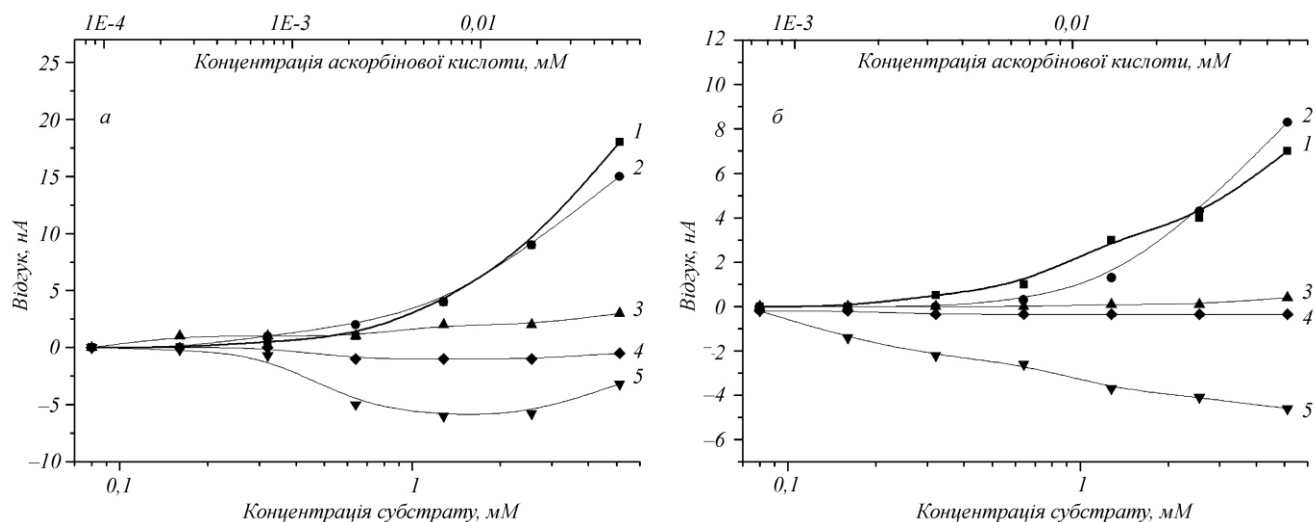


Рис. 2. Відгуки лабораторних прототипів амперометричних біосенсорів, створених на основі алкогольоксидази, іммобілізованої в парах глутарового альдегіду (а) та в полі-3,4-етилендіокситіофені (б) на внесення в електрохімічну комірку різних концентрацій етанолу (1); гліцеролу (2); глюкози (3); лактату (4); аскорбінової кислоти (5). Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, при потенціалі +200 мВ відносно електрода порівняння

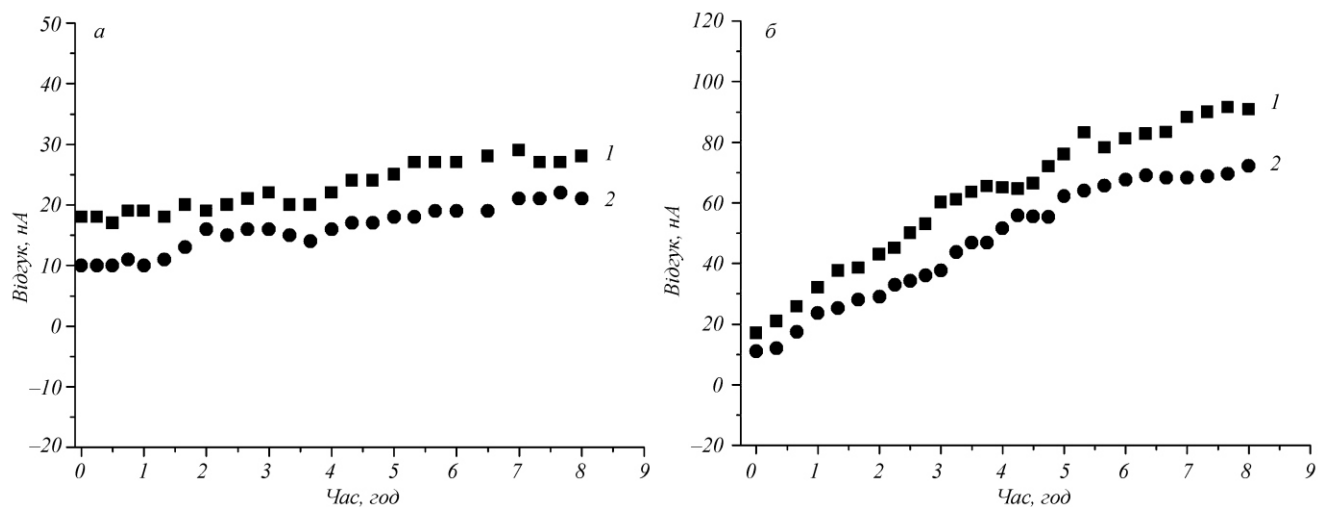


Рис. 3. Дослідження операційної стабільності лабораторних прототипів амперометричних біосенсорів, створених на основі алкогольоксидази, іммобілізованої в парах глутарового альдегіду (а) та в полі-3,4-етилендіокситіофені (б): 1 – відгук сенсора на додавання 20 мМ етанолу; 2 – 20 мкл проби вина «Портвейн червоний». Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, при потенціалі +200 мВ відносно електрода порівняння

близько 400 % (рис. 3, а, б), що ми пояснюємо поступовим встановленням більш ефективної взаємодії між іммобілізованим ферментом та поверхнею електрода, а також тим, що молекули ферменту протягом першої доби після іммобілізації набувають найоптимальнішої для їхнього функціонування конформації у мембрані.

Результати дослідження стабільності при зберіганні біосенсорів, розроблених із застосуванням

різних методів іммобілізації АО, представлено на рис. 4. Встановлено, що АО, електрохімічно іммобілізована у ПЕДТ, зберігає вихідний рівень сигналу лише протягом першого тижня після іммобілізації, а надалі поступово втрачає активність. Стабільність АО, іммобілізованої в ГА, є кращою: протягом 2–60 діб зберігання фермент демонструє близько 140 % від початкового сигналу, після чого рівень його активності поступово знижується.

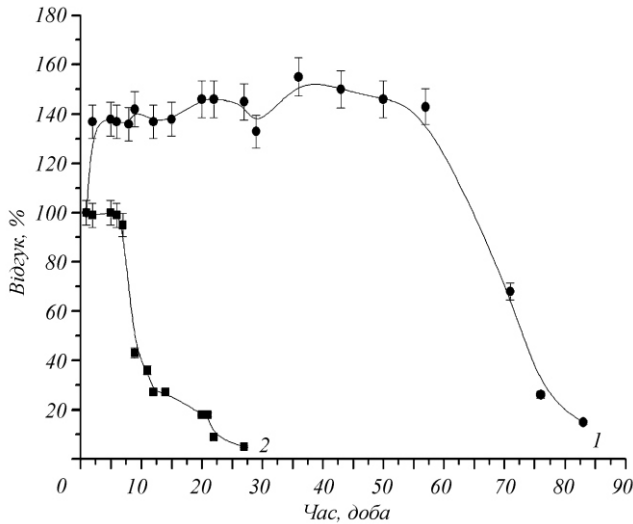


Рис. 4. Залежність величини відгуку лабораторних прототипів амперометричних біосенсорів, створених на основі алкогольоксидази, іммобілізованої в парах глутарового альдегіду (1) та в полі-3,4-етилендіокситіофені (2), від часу зберігання при температурі 4 °С у сухому стані. Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, при потенціалі +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння, концентрація етанолу становила 20 мМ

Таким чином, у результаті порівняльного аналізу двох способів іммобілізації АО метод іммобілізації ферменту у парах глутарового альдегіду у БСА-вмісній мембрані обрано як більш ефективний при розробці біосенсора для визначення етанолу у вині. Створений на основі даного методу іммобілізації ферменту біосенсор демонструє широкий динамічний діапазон роботи, достатню селективність та високу стабільність, що дозволяє застосовувати його для аналізу вин і виноматеріалів.

Також визначали рН-оптимум роботи біосенсора на основі іммобілізованої в парах ГА АО, який становив 7,2 (рис. 5, а). Зазначимо, що рН-оптимум вільної АО становить 7,5–8,0 [23, 24]. Відмінність рН-оптимуму від даного значення у разі датчика на етанол можна пояснити тим, що при роботі біосенсора протікає не лише ферментативна, але й електрохімічна реакція, що й викликає певний зсув оптимального значення рН [23].

Крім того, показано, що величина відгуку етанольного амперометричного біосенсора на основі АО, іммобілізованої в парах ГА, не залежить від значень буферної ємності та іонної сили робочого

розчину (рис. 5, б), що є типовим для амперометричних біосенсорів [4].

На першому етапі роботи з виноматеріалами визначали оптимальний ступінь розведення проб вина для їхнього аналізу за допомогою розробленого амперометричного біосенсора з АО в ГА. На рис. 6 представлено відгуки біосенсора на основі іммобілізованої в ГА алкогольоксидази на внесення в електрохімічну комірку 0,5, 1, 2,5, 5, 10 і 20 мкл проб трьох типів вин з різним вмістом етанолу (розведення у 10000, 5000, 2000, 1000, 500 і 250 разів відповідно).

Для аналізу використано проби столового вина «Монте Блан» (вміст етанолу, згідно з даними методу денситометрії дистилляту, 10,5 % об.), десертного вина «Кара-Даг» (16 % об. етанолу) та міцного вина «Мадера» (19 % об. етанолу). З даних рис. 6 видно, що в діапазоні розведень у 250–2000 разів спостерігається практично лінійна залежність між ступенем розведення проби та відгуком біосенсора для усіх трьох типів вин. Розведення ж у 5 і 10 тисяч разів є непридатними для сухих і десертних вин з невисоким вмістом етанолу. Щоб зменшити вплив на відгук біосенсора інтерферуючих речовин вина, для подальшої роботи обрали найвищий ступінь розведення проб із встановленого оптимального діапазону розведень – у 2000 разів.

При цьому максимально можливий вміст основних інтерферуючих речовин у суслі та вині, розведених у 2000 разів, є таким [1]: гліцерол – до 0,1 мМ, глюкоза – до 0,5 мМ, лактат – до 0,03 мМ, аскорбінова кислота – до 0,002 мМ. І, як свідчать результати, представлені на рис. 2, а, біосенсор на основі АО, іммобілізованої в ГА, є нечутливим до цих речовин у наведених концентраціях.

Для встановлення впливу на роботу створеного датчика на основі АО, іммобілізованої в ГА, інших компонентів вина (метанолу, ацетату, фенольних сполук тощо), нами проведено наступний дослід. До проби вина «Мадера» додали препарат АО у кількості 2,5 мг і здійснили інкубацію з ферментом для розщеплення етанолу (згідно з даними методу денситометрії дистилляту, вміст етанолу у даному вині становить 19 % об.).

Потім отримували відгуки біосенсора на внесення 10 мкл даної суміші, відібраної через певні

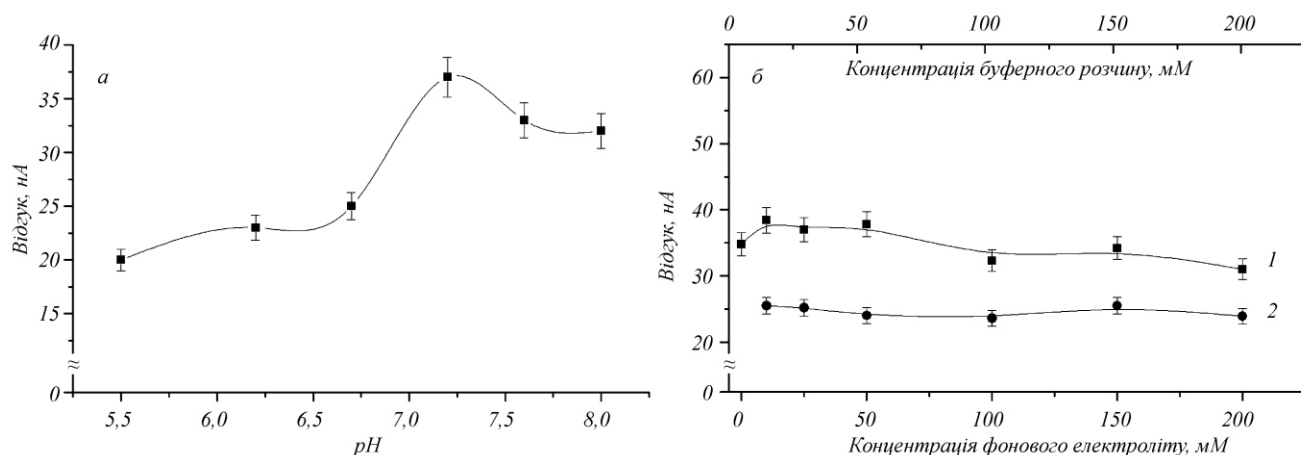


Рис. 5. Залежність величини відгуку амперометричного біосенсора на основі алкогольоксидази, іммобілізованої в парах глутарового альдегіду, від рН робочого розчину (а), концентрації фонового електроліту в буфері (б, крива 1) та концентрації буферного розчину (б, крива 2). Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, при потенціалі +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

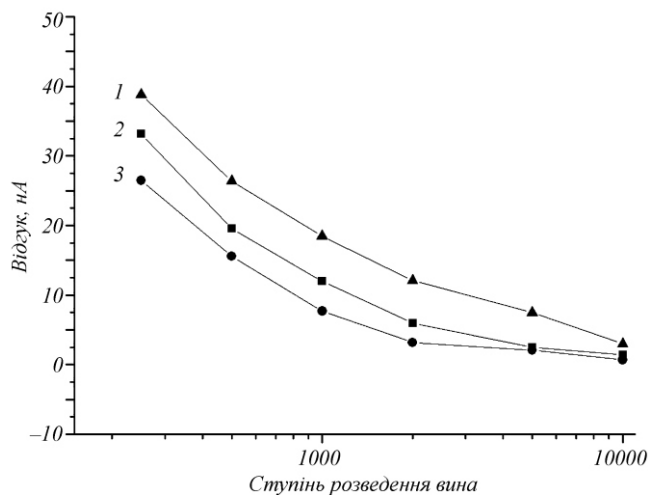


Рис. 6. Відгуки амперометричного біосенсора на основі іммобілізованої в парах глутарового альдегіду алкогольоксидази на внесення в електрохімічну комірку різних аліквот вина: 1 – «Мадера» (19 % об. етанолу); 2 – «Кара-Даг» (16 % об. етанолу); 3 – «Монте Блан» (10,5 % об. етанолу). Вимірювання проводили у 20 мМ фосфатному буфері, рН 7,2, при потенціалі +200 мВ відносно внутрішнього електрода порівняння

проміжки часу після змішування проби й ферменту. Показано, що вже через 1 год інкубації суміші величина відгуку біосенсора зменшилася на 33 %, через 7 год – на 50 %, а через добу інкубації вина з АО, коли етанол було повністю розщеплено ферментом, біосенсор давав величину відгуку на внесення проби вина в електрохімічну комірку лише 0,5 нА. Даний експеримент свідчить, що ми розробили дійсно

високоспецифічний і селективний біосенсор для аналізу етанолу у вині.

Наступним етапом роботи стало визначення за допомогою створеного біосенсора та оптимізованої методики вмісту етанолу у пробах вина та винома-теріалу і порівняння отриманих результатів із даними традиційного методу аналізу – денситометрії дистилляту. Об'єктом дослідження слугували 23 проби вина різних типів (сухі, напівсолодкі, десертні та міцні; білі, рожеві, червоні) та дві проби білого і червоного суслу. Отримані дані наведено у таблиці. Варто відмітити високу кореляцію між результатами, одержаними з використанням амперометричного біосенсора та класичного денситометричного методу визначення етанолу.

Таким чином, у ході роботи відпрацьовано методику визначення етанолу у вині за допомогою амперометричного біосенсора на основі платинового друкованого електрода SensLab та алкогольоксидази. Досліджено робочі характеристики амперометричних біосенсорів, розроблених із застосуванням двох різних методів іммобілізації АО. Показано, що датчик на основі АО, іммобілізованої у парах глутарового альдегіду, демонструє нижчу межу визначення субстрату та кращу стабільність у порівнянні з біосенсором з АО, іммобілізованою у ПЕДТ, тому саме даний метод іммобілізації ферменту застосували при розробці біосенсора для аналізу етанолу у вині. Встановлено рН-оптимум роботи амперомет-



Концентрація етанолу у зразках вина та виноградного суслу, визначена за допомогою біосенсора та методу денситометрії дистилляту

Проба	Тип	Концентрація етанолу, % об.	
		Біосенсор*	Денситометричний метод
«Монастирська ізба»	Біле, столове, напівсолодке	10,7	10,4
Монте Блан «Коктебель»	Біле, столове, напівсолодке	10,5	10,4
«Ведмежа кров»	Червоне, столове, напівсолодке	11,2	10,5
Бастардо «Калістон»	Червоне, столове, напівсолодке	12,5	12,0
Ркацителі «Коктебель»	Біле, столове, сухе	12,7	12,0
Аліготе «Коктебель»	Біле, столове, сухе	11,6	11,2
Фетяска «Голіцинські вина»	Біле, столове, сухе	12,7	12,0
Мерло «Коблево»	Червоне, столове, сухе	12,1	12,0
Каберне «Коктебель»	Червоне, столове, сухе	9,6	11,2
Каберне «Голіцинські вина»	Червоне, столове, сухе	12,0	12,0
Мускат білий	Біле, десертне	15,6	15,7
Кокур «Коктебель»	Біле, десертне	18,1	16,0
Кара-Даг «Коктебель»	Червоне, десертне	16,3	16,0
Кагор «Діоніс»	Червоне, десертне	16,6	16,0
Кагор «Український»	Червоне, десертне	15,9	16,1
Мадера	Біле, міцне	18,9	18,0
Мадера «Масандра»	Біле, міцне	19,6	19,0
«Приморське»	Біле, міцне	16,9	17,5
Херес солодкий «Діоніс»	Біле, міцне	17,8	17,0
Портвейн білий	Біле, міцне	18,4	17,0
Портвейн 777 рожевий	Рожеве, міцне	18,2	17,5
Портвейн 777 червоний	Червоне, міцне	18,8	17,5
Марсала «Масандра»	Червоне, міцне	18,1	18,5
Сусло біле	–	0,8	–
Сусло червоне	–	0,3	–

\*Відносне стандартне відхилення 6,2 %

ричного біосенсора на основі іммобілізованої в парах ГА алкогільоксидази і показано, що величини буферної ємності та іонної сили робочого розчину не впливають на відгук створеного датчика. Підібрано оптимальний ступінь розведення проб вина

для їхнього аналізу за допомогою біосенсора на основі АО, при якому нівелюється вплив на його роботу інтерферуючих речовин, що містяться у вині. За допомогою розробленого біосенсора проведено аналіз концентрації етанолу у винах різного

типу та в суслі. Показано високу кореляцію результатів, отриманих за допомогою етанольного амперометричного біосенсора, із даними традиційного методу аналізу етанолу – денситометрії дистилляту.

Частину цієї роботи виконано завдяки фінансовій підтримці НАН України в рамках комплексної науково-технічної програми «Сенсорні системи для медико-біологічних та промислово-технічних потреб».

*T. B. Goriushkina, A. P. Orlova, G. M. Veryk, A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych*

The procedure of ethanol determination in wine by enzyme amperometric biosensor

Summary

**Aim.** Development of the procedure of ethanol determination in wine by an enzyme amperometric biosensor. **Methods.** The amperometric biosensor method of ethanol analysis has been used in this work. **Results.** The paper presents comparative analysis of two methods of alcohol oxidase (AO) immobilization for development of amperometric biosensor for ethanol determination in wine. The method of AO immobilization in glutaraldehyde vapour was chosen as optimal for this purpose. The selectivity, operational and storage stability, and pH-optimum for operation of the created biosensor were determined. The procedure of ethanol determination in wine by amperometric biosensor on the basis of platinum printed electrode SensLab and AO was optimized. The analysis of ethanol concentration in wine and must samples was carried out using the developed high-stable biosensor. A good correlation between the data obtained by the biosensor and densitometry methods was shown. **Conclusion.** The proposed method of ethanol analysis could be used in wine production.

**Keywords:** amperometric biosensor, alcohol oxidase, ethanol, wine, must.

*T. B. Горюшкина, А. П. Орлова, Г. Н. Верик, А. П. Солдаткин, С. В. Дзядевич*

Методика определения этанола в вине ферментным амперометрическим биосенсором

Резюме

**Цель.** Разработка методики определения этанола в вине ферментным амперометрическим биосенсором. **Методы.** Использован ферментный амперометрический биосенсорный метод анализа этанола. **Результаты.** Проведен сравнительный анализ эффективности применения двух методов иммобилизации алкогольоксидазы (АО) при разработке амперометрического биосенсора для анализа этанола в вине. Выбран метод иммобилизации фермента в парах глутарового альдегида, при использовании которого иммобилизованная АО демонстрирует лучшие рабочие характеристики. Исследованы селективность, операционная стабильность и стабильность при хранении созданного биосенсора, определен pH-оптимум его работы. Отработана методика определения этанола в вине с помощью амперометрического биосенсора на основе платинового электрода SensLab и АО. С применением разработанного

высокостабильного биосенсора проанализирована концентрация этанола в образцах вина и сусли. Показана высокая корреляция полученных результатов с данными метода денситометрии дистиллята. **Выводы.** Предложенную методику анализа этанола можно в дальнейшем использовать в виноделии.

**Ключевые слова:** амперометрический биосенсор, алкогольоксидаза, этанол, вино, сусло.

## PERELIK LITERATURY

1. Goriushkina T. B., Dzyadevych S. V. Grape wines. Chemical composition and methods determination // *Biotechnology*.—2008.—1, N 2.—P. 24–38.
2. Gonchar M. V. Traditional and enzymatic methods of ethanol determination in biological solutions // *Laboratornaya diagnostika*.—1999.—N 1.—P. 45–49.
3. Niculescu M., Erichsen T., Sukharev V., Kerenyi Z., Csoregi E., Schuhmann W. Quinohemoprotein alcohol dehydrogenase-based reagentless amperometric biosensor for ethanol monitoring during wine fermentation // *Anal. Chim. Acta*.—2002.—463, N 1.—P. 39–51.
4. Goriushkina T. B., Dzyadevych S. V. Enzyme biosensors for quantitative analysis of wine components // *SEMST*.—2008.—N 1.—P. 49–67.
5. Lapa R., Lima J., Pinto I. Development of a sequential injection analysis system for the simultaneous biosensing of glucose and ethanol in bioreactor fermentation // *Food Chem.*—2003.—81.—P. 141–146.
6. Segundo M., Lima J., Rangel A. Automatic flow systems based on sequential injection analysis for routine determinations in wines // *Anal. Chim. Acta*.—2004.—513.—P. 3–9.
7. Bucur B., Mallat E., Gurban A.-M., Gocheva Y., Velasco C., Marty J.-L., Noguer T. Strategies to develop malic acid biosensors based on malate quinone oxidoreductase (MQO) // *Biosensors and Bioelectronics*.—2006.—21.—P. 2290–2297.
8. Legin A., Rudnitskaya A., Lvova L., Vlasov Y., Di Natale C., D'Amico A. Evaluation of Italian wine by the electronic tongue: recognition, quantitative analysis and correlation with human sensory perception // *Anal. Chim. Acta*.—2003.—484.—P. 33–44.
9. Mazzei F., Botre F., Favero G. Peroxidase based biosensors for the selective determination of D, L-lactic acid and L-malic acid in wines // *Microchem. J.*—2007.—87.—P. 81–86.
10. Azevedo A. M., Prazeres M. F., Cabral J. M. S., Fonseca L. P. Ethanol biosensors based on alcohol oxidase // *Biosensors and Bioelectronics*.—2005.—21.—P. 235–247.
11. Castillo J., Gaspar S., Leth S., Niculescu M., Mortari A., Bontidean I., Soukharev V., Dorneanu S. A., Ryabov A. D., Csoregi E. Biosensors for life quality. Design, development and applications // *Sensors and Actuators B*.—2004.—102.—P. 179–194.
12. Patel N. G., Meier S., Cammann K., Chemnitz G. C. Screen-printed biosensors using different alcohol oxidases // *Sensors and Actuators B*.—2001.—75, N 1–2.—P. 101–110.
13. Smutok O., Ngounou B., Pavlishko H., Gayda G., Gonchar M., Schuhmann W. A reagentless bienzyme amperometric biosensor based on alcohol oxidase/peroxidase and an Os-complex modified electrodeposition paint // *Sensors and Actuators B*.—2006.—113, N 2.—P. 590–598.
14. Shkotova L. V., Slast'ya E. A., Zhylyakova T. A., Soldatkin A. P., Schuhmann W., Dzyadevych S. V. Amperometric biosen-

- sor for ethanol analysis in wines and must during wine fermentation // *Ukr. Biochem. J.*—2005.—**77**, N 1.—P. 96–103.
15. *De Luca S., Florescu M., Ghica M. E., Lupu A., Palleschi G., Brett C. M. A., Compagnone D.* Carbon film electrodes for oxidase-based enzyme sensors in food analysis // *Talanta.*—2005.—**68**, N 2.—P. 171–178.
  16. *Gouveia-Caridade C., Pauliukaite R., Brett C. M. A.* Development of electrochemical oxidase biosensors based on carbon nanotube-modified carbon film electrodes for glucose and ethanol // *Electrochim. Acta.*—2008.—**53**—P. 6732–6739.
  17. *Carelli D., Centonze D., De Giglio A., Quinto M., Zambonin P. G.* An interference-free first generation alcohol biosensor based on a gold electrode modified by an overoxidised non-conducting polypyrrole film // *Anal. Chim. Acta.*—2006.—**565**—P. 27–35.
  18. *De Prada A. G.-V., Pena N., Mena M. L., Reviejo A. J., Pingarron J. M.* Graphite–Teflon composite bienzyme amperometric biosensors for monitoring of alcohols // *Biosensors and Bioelectronics.*—2003.—**18**, —P. 1279–1288.
  19. *Boujtita M., Chapleau M., Murr N.* Biosensors for analysis of ethanol in food: effect of the pasting liquid // *Anal. Chim. Acta.*—1996.—**319**, N 1–2.—P. 91–96.
  20. *Goriushkina T. B., Shkotova L. V., Slast'ya E. A., Soldatkin A. P., Dzyadevych S. V.* Optimization of methods of lactate determination in wine by amperometric enzyme biosensor // *SEMST.*—2008.—N 2.—P. 39–47.
  21. *Zhang S., Wright G., Yang Y.* Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction // *Biosensors and Bioelectronics.*—2000.—**15**—P. 273–282.
  22. *Sanz V., Mena M. L., Gonzelez-Cortes A., Yanez-Sedeno P., Pingarron J. M.* Development of a tyrosinase biosensor based on gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes. Application to the measurement of a bioelectrochemical polyphenols index in wines // *Anal. Chim. Acta.*—2005.—**528**—P. 1–8.
  23. *Boujtita M., Hart J. P., Pittson R.* Development of a disposable ethanol biosensor based on a chemically modified screen-printed electrode coated with alcohol oxidase for the analysis of beer // *Biosensors and Bioelectronics.*—2000.—**15**, N 5–6.—P. 257–263.
  24. *Wen G., Zhang Y., Shuang S., Dong C., Choi M. M. F.* Application of a biosensor for monitoring of ethanol // *Biosensors and Bioelectronics.*—2007.—**23**, N 1.—P. 121–129.

УДК 577.15+573.6

Надійшла до редакції 26.03.09