



基于酶电极的乳酸检测生物传感器*

陈彦儒^{1,2)} 公维丽^{1,2)**} 马耀宏^{1,2)} 王丙莲^{1,2)} 张振宇^{1,2)} 孟庆军^{1,2)} 杨 艳^{1,2)}
杨俊慧^{1,2)} 刘庆艾^{1,2)} 郑 岚^{1,2)}⁽¹⁾ 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 济南 250103; ⁽²⁾ 山东省生物传感器重点实验室, 济南 250103)

摘要 乳酸($C_3H_6O_3$), 又名2-羟基丙酸、丙醇酸, 属于羧基酸的一种。乳酸在食品工业、临床医学、生物技术等行业具有极其重要的意义, 因此如何高通量检测不同样品中的乳酸成为目前业界研究的重点。传统乳酸检测方法操作繁琐、费时费力或需要昂贵的检测设备, 乳酸生物传感器可以克服这些限制, 不需要样品制备, 能够快速、简便、可靠地定量测定食品或血浆中的乳酸, 具有广阔的应用前景。乳酸酶电极生物传感器主要有两种类型——基于L-乳酸氧化酶(L-LOD)和L-乳酸脱氢酶(L-LDH)的乳酸生物传感器。本文综述了L-LOD和L-LDH结构特征、来源及催化机理, 讨论了改善基于酶电极的乳酸传感器性能的3种策略(电极材料改造策略、酶固定化策略、酶分子工程改造策略), 还根据用于制造乳酸生物传感器的不同载体包括膜、透明凝胶基质、水凝胶载体、纳米颗粒等对乳酸生物传感器进行了归类分析, 最后本文将目前商品化应用的酶电极乳酸生物传感器特点进行了对比总结讨论, 阐述了乳酸生物传感器的未来应用方向, 并对未来发展前景进行了展望。

关键词 乳酸检测, 乳酸生物传感器, L-乳酸氧化酶, L-乳酸脱氢酶

中图分类号 Q5, Q55

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0220

乳酸是葡萄糖在组织中厌氧分解的最终产物^[1], 也是细胞、组织和生物体液中缺氧的标志^[2]。作为评估患者健康状况和疾病研究的关键参数, 乳酸浓度已被广泛用于临床诊断中, 用于评估患者的健康状况和疾病研究, 并用于外科^[3-4]、运动医学^[5]、休克/创伤^[6]和食品工业^[7-8]的持续监测(图1)。

乳酸监测对于诊断和评估与乳酸酸中毒相关的健康问题以及在缺氧情况下(体内乳酸水平超过可接受的值)的健康问题至关重要。乳酸盐是厌氧代谢途径的关键代谢产物, 当组织的能量需求不能通过有氧呼吸来满足时, 厌氧代谢会使乳酸浓度增加。如果肝脏和肾脏没有足够的清除, 乳酸的积累浓度会导致乳酸酸中毒^[9]。研究表明, 早期乳酸清除可以改善严重脓毒症和脓毒症休克的治疗结果, 这可能会降低脓毒症相关的死亡率^[10]。因此, 患者的血乳酸水平可作为疾病严重程度的警报信号, 也可用于改善广泛疾病的诊断和治疗。此外, D-乳酸的测定在牙科中具有实际意义, 因为菌斑

沉积物中细菌产生的乳酸在龋齿的形成中起着重要作用^[11]。

在运动医学中, 乳酸检测 also 具有重要意义, 特别是在体育运动中测定体能。运动过程中血液乳酸水平被用作运动训练状态和健康状况的指标, 因为血液乳酸水平升高会导致血液pH值降低, 最终导致疲劳^[12]。

乳酸浓度的测量不仅在医学上很重要, 很多食品和相关产品都含有乳酸。乳制品行业也进行乳酸和丙酮酸的测定, 以控制乳酸发酵的流程, 并评估精制产品的质量^[13-14]。细菌合成D-乳酸, 而真核生物合成L-乳酸, 这可以区分产品中发生的发酵过程; 同时, D-乳酸是包装肉类、鱼和果汁细菌污染的指示物^[15]。在葡萄酒行业, 乳酸水平可以

* 国家重点研发计划(2021YFB3201200, 2021YFB3201203), 国家自然科学基金(32101222)和齐鲁工业大学科教产教融合试点工程培优项目(2022PY067)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 15264110812, E-mail: 15264110812@163.com

收稿日期: 2022-05-12, 接受日期: 2022-07-04

评估苹果酸-乳酸发酵过程。在生物技术产业,乳酸含量可以评估工业发酵进程,检测细胞培养程度。

如上所述,乳酸作为一种代谢产物,由于检测和测量其在各种介质中存在的重要性,已经引起了许多行业的极大兴趣。目前已有多种常规方法用于乳酸的检测和定量,常用的方法包括比色法^[16-18]、分光光度法^[19]、荧光法^[20]、高效液相色谱法^[21-22]和液相色谱-质谱法^[23]。由于传统分析方法价格昂贵,样品前处理复杂(样品提取、稀释),因此不能在基本的实验室现场实施。

而酶电极生物传感器是一种以酶分子为识别元件,以电化学电极作为信号转换元件,通过信号转换器将对目标物浓度的检测转换为可测量的电势、电流或电导率信号的小型化定性或定量分析设备^[24]。具有简单、便携、直接和实时的优点,最少或不需

要样品制备。酶电极生物传感器还具有响应快、特异性高、成本低和操作方便的优点^[25],可以克服传统技术的局限性,在乳酸检测方面有广阔的应用前景^[26]。

本文简要介绍了用于乳酸酶电极生物传感器制造的主要酶分子L-乳酸氧化酶(LOD)和L-乳酸脱氢酶(LDH)的结构特征、来源及催化机理,讨论了电极材料改造策略、酶固定化策略以及酶分子工程改造策略对改善基于酶电极的乳酸传感器性能开展的相关研究,归类分析了基于不同载体的包括膜、透明凝胶基质、水凝胶载体、纳米颗粒的乳酸生物传感器,并对商品化应用的酶电极乳酸生物传感器特点进行了对比总结分析,阐述了乳酸生物传感器的未来应用方向,以期能为L-乳酸生物传感器升级换代提供理论基础。

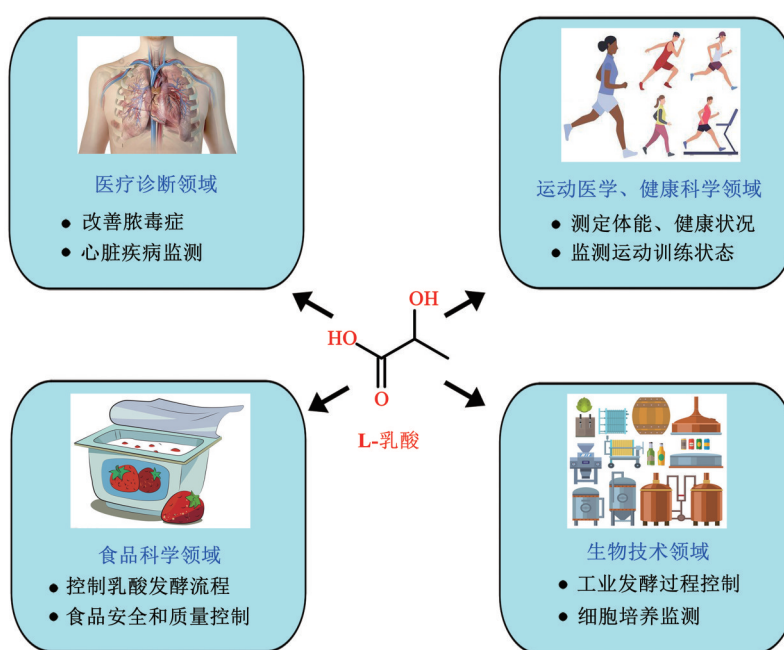


Fig. 1 Application of L-lactic acid detection in food science, biotechnology and medical fields^[26]

图1 L-乳酸检测在食品科学、生物技术和医疗领域的应用^[26]

1 酶电极乳酸传感器检测原理

电化学生物传感器^[27]是基于电化学分析方法发展的一种新型检测技术,以电极作为转换元件和固定载体,将生物敏感物质(酶、抗原、抗体、核酸等)或者生物(微生物)本身作为敏感元件固定在电极上,通过生物分子之间的特异性识别作用,

将目的分子与其反应信号转化成电信号,反应过程中产生的电信号响应值与特定样品中该物质的浓度成正相关,从而实现对目的分析物的定性或定量检测^[28-29]。

酶电极传感器是由固定化酶与电流型电极或电位型电极组合而成的生物传感器^[30],电流型(安培法)是一种特殊的电化学技术,它利用了某些电

活性物质在恒定外加电位驱动的惰性金属电极上被氧化或还原(氧化还原反应)的原理^[31], 当在工作电极和参比电极之间施加恒定电位时, 在电活性物质存在的情况下, 由氧化还原反应产生的电活性物质传感器的电流响应与被测分析物(乳酸等)的浓度线性相关。例如, 使用饱和的银/氯化银作为参比电极, 通过固定化酶控制工作电极上的电位, 使工作电极上的电位随着工作电极和对电极之间的电流流动而保持稳定和可重复的电位^[32]。与电导式和电位式生物传感器相比, 电流型酶生物传感器具有更灵敏、快速、廉价和一次性的优点^[33], 因此成为研究的热点。

在电化学传感中, 广泛使用两电极或三电极传感平台^[34]检测分析物(图2), 其中参比电极(通常由Ag/AgCl制成)置于工作电极附近, 用于提供稳定和可重复的电位, 与工作电极电位进行比较, 工作电极用作换能器, 表面会发生电子转移, 对电极与工作电极组成电流回路。

传感器由分子识别系统和物理化学传感器组成。识别系统与未知分析物发生反应, 而传感器将化学反应所引起的变化转化为电信号。图2展示了一个标准的三电极电化学反应系统, 使用所制备的酶分子修饰的商用玻碳电极(GCE)作为工作电极, 铂丝和银/氯化银电极分别用作对电极和参比电极^[35]。

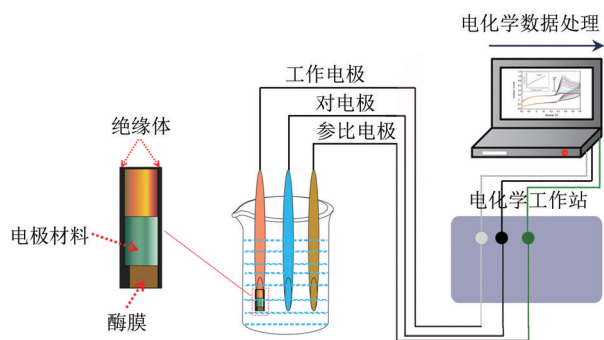


Fig. 2 Three-electrode electrochemical reaction system

图2 三电极电化学反应系统

2 酶电极乳酸传感器涉及的酶

酶偶联生物传感电极中酶位于电极表面, 催化目标检测物发生反应, 生成电活性物质或者消耗电活性反应物。电活性物质的产生或者消耗会引起电流变化, 通过测量电流变化就可以实现对分析物浓

度的直接测量。在乳酸生物传感器的制作过程中, 最常用的生物识别元件是L-乳酸氧化酶(L-LOD)和L-乳酸脱氢酶(L-LDH)。

2.1 L-乳酸氧化酶(LOD)结构特征、来源及催化机理

L-LOD (EC 1.1.3.2) 是黄素单核苷酸(FMN)依赖的 α -羟基酸氧化黄素蛋白家族的成员^[36], 呈几乎对称的四聚体结构, 每个亚基具有约374个氨基酸, 1个FMN辅基, 分子质量约为160 ku, 其晶体几何尺寸显示为直径19 nm的立方结构(图3a), 从Uniprot数据库中下载L-LOD序列并进行进化分析显示, L-LOD可从多种细菌来源获得, 如链球菌属(*Streptococcus* sp)、肠球菌属(*Enterococcus* sp)、沙门氏菌属(*Salmonella* sp)等(图3b)。黄素蛋白经脱氢酶催化的反应过程非常复杂, 这是由它内在的双重功能决定的。一方面, 它通过打开其中一个底物(供体)动力学上稳定的C-H键, 吸收氧化还原当量; 另一方面, 氧化还原当量转移到多个受体上^[37]。L-LOD可以将氧化L-乳酸产生的电子传递给FMN, 生成丙酮酸和FMNH₂, FMNH₂可以继续将电子传递给O₂, 生成H₂O₂, 这一催化过程的最适pH一般在pH 7.5左右(图3c)。由于FMN和酶蛋白结合非常牢固, 与乳酸反应不需要游离的外源辅酶参与, 因此在乳酸生物传感器的制造中, L-LOD是常用的生物识别元件。乳酸氧化酶传感器使用氧作为电子受体, 通过L-LOD和氧传感器^[38]的组合来检测依赖于乳酸浓度的氧浓度降低。或者将L-LOD与铂电极结合, 通过检测乳酸氧化产生的过氧化氢来测定底物^[39-40]。然而, 电化学检测酶促反应产生的过氧化氢需要较高的氧化电位, 这会导致电可氧化物质的干扰。此外, 溶液中氧浓度的波动带来了系统的复杂性, 影响检测限。解决氧浓度问题的方法之一是使用L-乳酸脱氢酶作为识别传感元件。

2.2 L-乳酸脱氢酶(LDH)结构特征、来源及催化机理

L-LDH (EC 1.1.2.3) 广泛分布于微生物、植物和动物细胞内, 是生命活动中最重要能源物质“糖”无氧酵解途径的关键酶之一^[41], 具有重要的医学意义。存在于血细胞和心肌等组织中的L-LDH, 通常在组织损伤时释放, 所以它基本上是常见损伤和疾病的标志。LDH实际上是一个具有5种分子形态的同工酶族, 含有4个亚基, 每个亚基可以结合1个NAD(P)⁺分子, 分子质量130~145 ku,

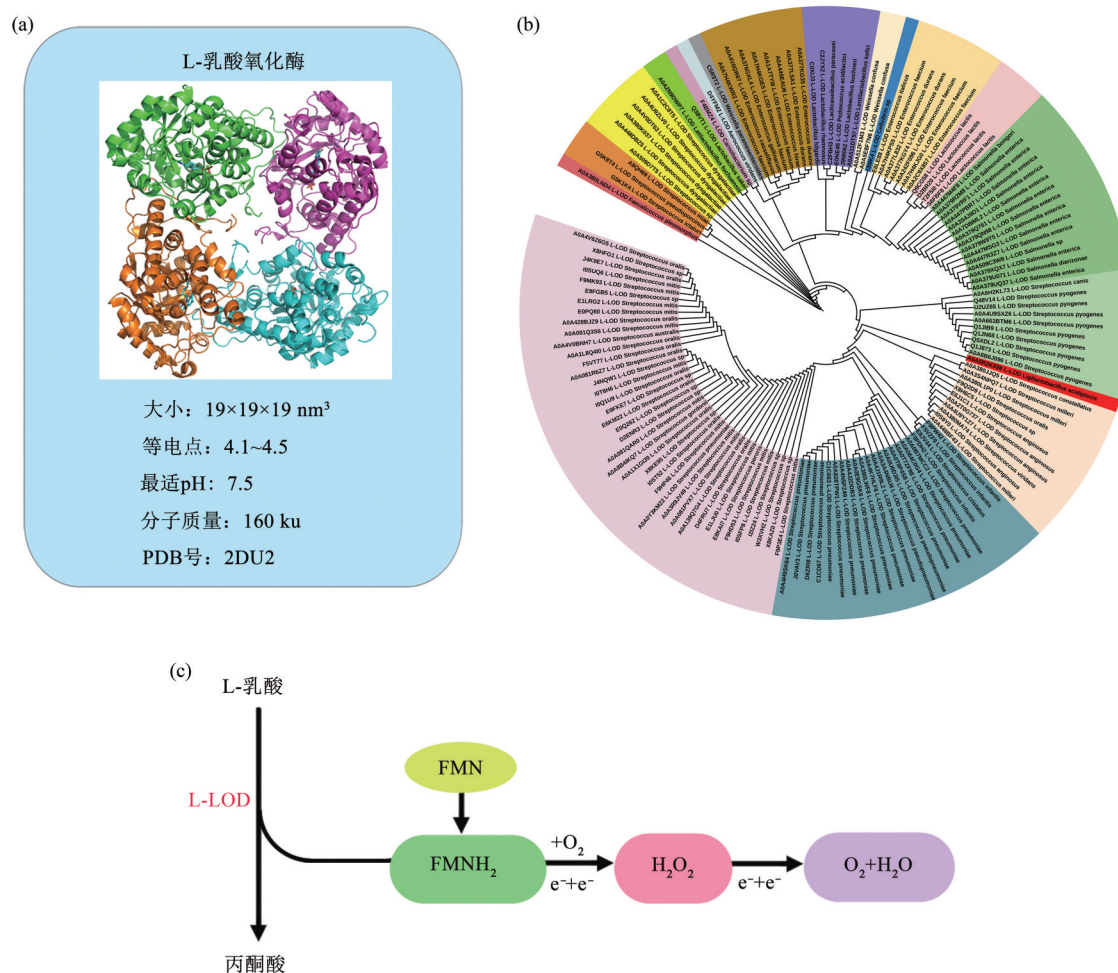


Fig. 3 Structural characteristics, origin and catalytic mechanism of L-LOD

图3 L-LOD结构特征、来源及催化机理

(a) L-LOD的三维结构和理化性质，2DU2结构图利用Pymol软件制作。(b) L-LOD的序列进化分析，系统发育树表征了142条已知的L-LOD序列。序列描述包括UniProt代码、物种名称。用UltraEdit对数据进行处理，MEGA5进行序列比对，选择NJ法构建进化树，利用iTOL对进化树进行美化。(c) L-LOD的催化机理图。

晶体结构尺寸约为 $6 \times 8 \times 14 \text{ nm}^3$ [42] (图4a)。不同种类LDH分子中相同亚基的活性中心非常相似，并且每个亚基上的催化反应之间没有显著的相互作用 [43]。

L-LDH是生命活动的关键酶之一 [44]，由图4b可以看出，L-LDH明显比L-LOD分布的微生物种属范围更加广泛，产L-LDH的乳酸菌可从多种细菌来源获得，如乳杆菌属 (*Lactobacillus* sp)、类诺卡氏属 (*Nocardoides* sp)、红球菌属 (*Rhodococcus* sp) 等 (图4b)。L-LDH属于催化 α -羟基酸氧化的氧化还原酶，对L-乳酸转化为丙酮酸和NADH有较高的催化活性酶，它将催化L-乳酸脱氢产生的电子传给NAD(P)⁺分子，生成丙酮

酸和NAD(P)H，NAD(P)H可以进一步将电子传递到电极等电子受体上 (图4c)，但是在催化过程中辅酶NAD(P)⁺分子需要先结合到酶分子上才能成功与L-乳酸结合。在酶分子内部可以通过不同氨基酸残基之间形成溶剂化/氢键导致内部结构重排，从而形成形状上的改变。这些重排也使NAD(P)⁺辅酶分子和L-乳酸有效结合到内部的活性位点。

基于L-LDH的氧化还原机理，这类酶也被广泛用作生物传感器制造的重要候选传感元件 [45-47]。随着不同传感器使用的不断改进和高纯度酶的问世，基于L-LDH的生物传感器也在不断得到改进。基于L-LDH的生物传感器在辅酶 (NAD⁺或

NADP) 存在的情况下工作, 辅酶充当介体在酶和电极之间传递电子。在电极表面, NADH 在外加电位的影响下被氧化, 氧化电流与溶液中 L-乳酸浓度成正比。由于 L-LDH 不依赖于氧气, 可以直接将电子传递到电极上, 并且具有更高的底物专一性, 因此 L-LDH 在制备第三代乳酸传感器中具有广阔的应用前景。但是基于 L-LDH 的传感器也有

一些缺点, 如辅酶 NAD⁺ 或 NADP 与酶分子结合不牢固, 需要额外添加辅酶, 提高了传感器的制作成本, 降低了可重复利用、稳定性等性能, 并且 NADH 的电化学氧化通常发生在高过电位下进行, 这些高电位也引起实际样品中通常存在的其他电催化活性物质的干扰。

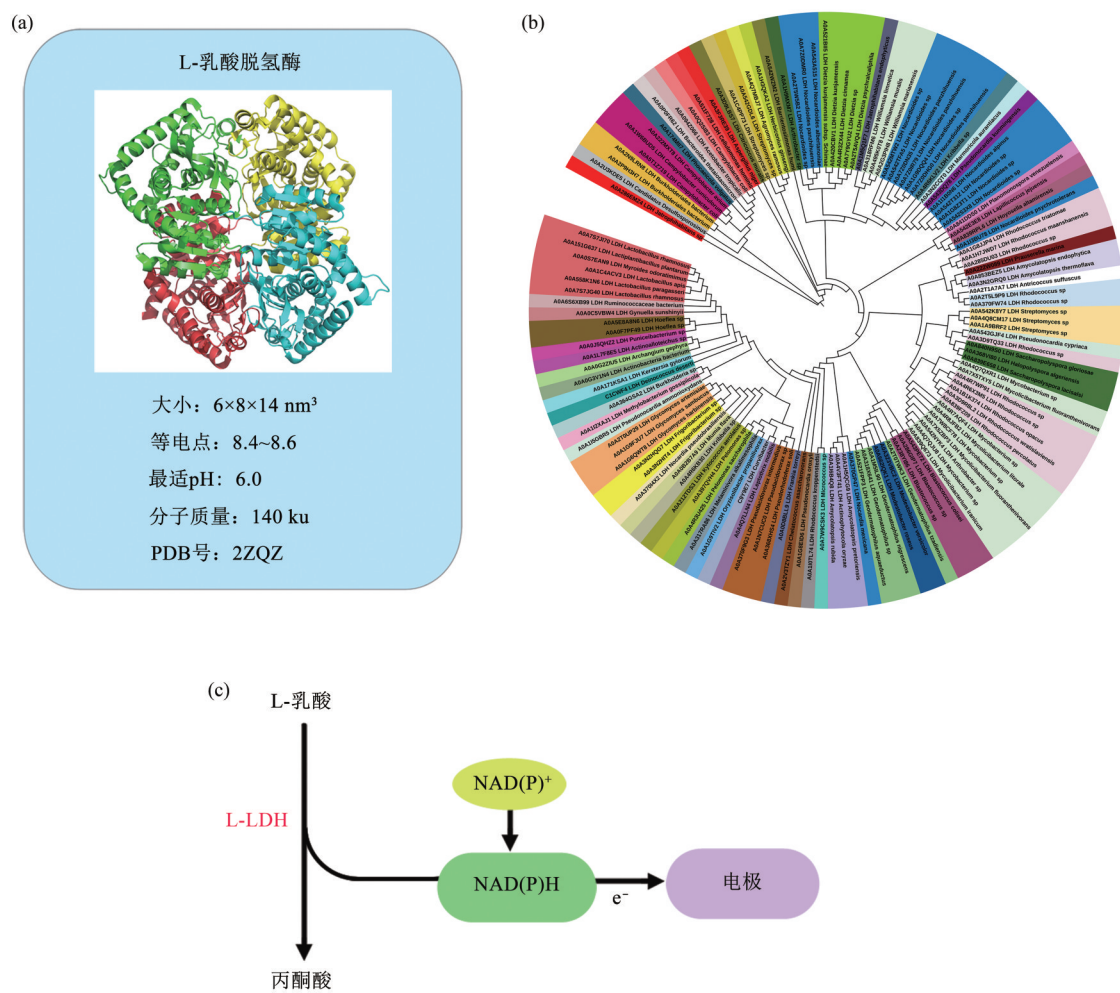


Fig. 4 Structural characteristics, origin and catalytic mechanism of L-LDH

图4 L-LDH结构特征、来源及催化机理

(a) L-LDH的三维结构和理化性质, 2ZQZ结构图利用Pymol 软件制作。(b) L-LDH的序列进化分析, 系统发育树表征了135条已知的L-LDH序列。序列描述包括UniProt代码、物种名称。用UltraEdit对数据进行处理, MEGA5进行序列比对, 选择NJ法构建进化树, 利用iTOL对进化树进行美化。(c) L-LDH的催化机理图。

3 酶电极乳酸传感器性能提升改进策略

制备酶电极乳酸传感器最首要的一步是通过固定, 创造一个稳定的环境使酶分子在工作电极表面保持其结构、流动性和生物催化活性, 并且可以直接或通过电子传递介质与电极相互作用。但是由于

酶分子结构特征、反应机理、电极材料等条件的限制, 传统的酶电极乳酸传感器在灵敏度、选择性和稳定性方面具有一定的局限性。生物活性酶分子具有特定三维空间结构, 其活性中心需要保持特定取向才可以快速结合、催化底物并完成电子传递, 但在酶固定到电极表面过程中通常使用化学试剂交联

导致酶分子活性构象改变、活性丧失,影响传感器的灵敏度和稳定性;此外,有些来源的酶分子对目标底物的选择特异性较差,使传感器的选择性和抗干扰能力不高;再者,如2.1和2.2部分提到的L-LOD和L-LDH的催化特点,L-LOD以氧气作为电子受体,检测信号通常受氧分压的影响,不适用于检测包括静脉血、动脉血、高海拔等氧气含量不同的样本,而且过氧化氢氧化的高电位也使得血液中的某些电活性物质如抗坏血酸、对乙酰氨基酚和尿酸极易在电极表面被氧化,影响测定结果的准确

性,而L-LDH辅酶不可再生性和辅酶的催化高电位,也使经济性、重现性和稳定性等性能受影响。

因此研究者试图通过不同的策略来改进乳酸传感器的性能,这些策略通常根据酶、反应和电极中发生的电子传输类型而定制的,总之,设计一个成功的基于酶的L-乳酸生物传感器需要将酶组装到固体载体上,并在酶反应和载体之间选择合适的转导策略,以促进酶和电极之间的电子转移。综合来看主要从电极材料改造策略、酶固定化策略、酶分子工程改造策略3方面入手(图5)。

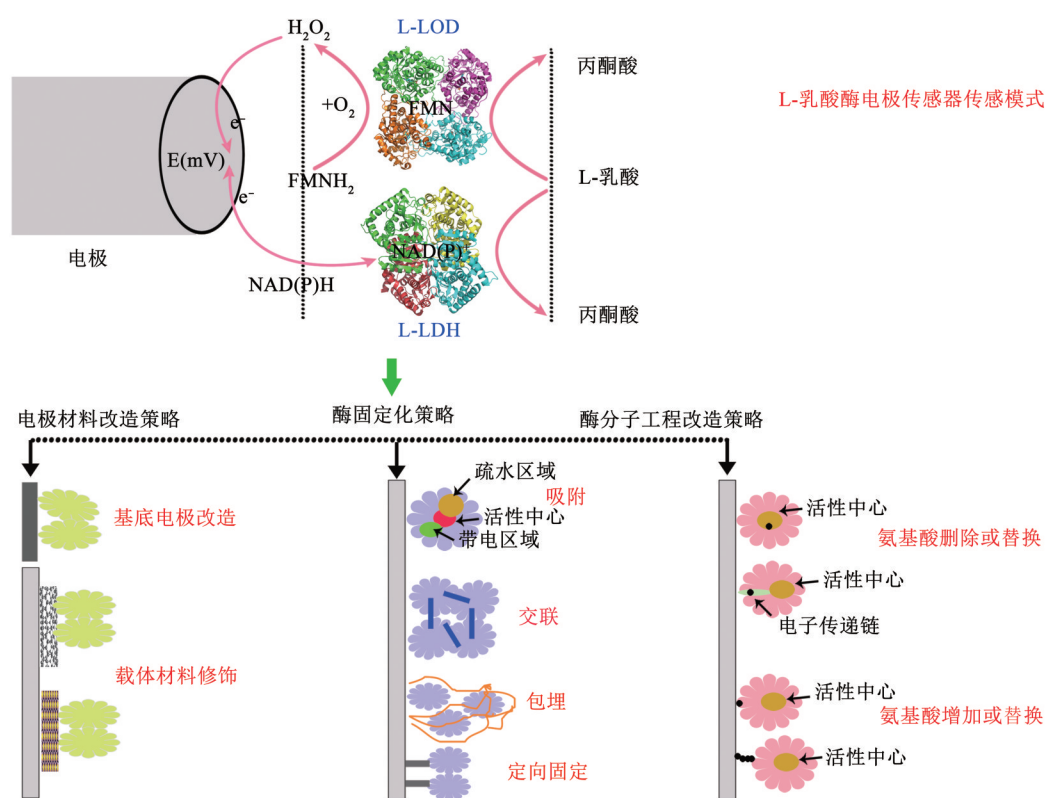


Fig. 5 Strategies for the performance improvement of lactate biosensors based on enzyme electrode

图5 酶电极乳酸传感器性能提升改进策略

3.1 电极材料改造策略

如第1部分提到的, 安倍测量用到的电化学电池组件通常为三电极系统——工作电极、参比电极和对电极。工作电极是用不同电活性材料制成的主电极, 表面会发生电子转移。工作电极的选择主要取决于目标分析物的氧化还原行为和测量所需电位区域的背景电流, 一个工作电极或一组工作电极(金属或碳基材料)^[48]上需保持恒定的电位。参比电极(Ag/AgCl)用于提供稳定和可重复的电位, 然后与工作电极电位进行比较。

在乳酸生物传感器的构建中, 金、铂和玻碳是最常见的工作电极材料。有学者发现, 在L-乳酸脱氢酶的作用下, 铂电极比玻碳电极^[49]更不容易被污染。碳基工作电极以碳糊、碳粉、碳纤维、玻碳电极、石墨基油墨丝网印刷电极或石墨电极的形式使用, 由于碳电极会减缓电子转移速度, 所以它们较少应用于以L-乳酸盐为基础的生物传感器^[50]的制备。

利用纳米材料修饰电极表面可以提高酶生物传感器的灵敏度, 主要原理是纳米具有小尺寸效应、

表面效应、量子尺寸效应和宏观量子隧道效应, 显著增加了电极的表面积, 从而导致识别层中可以承载更多的酶。多种纳米材料, 包括碳纳米管 (CNTs)^[46, 51]、金纳米粒子 (AuNPs)^[52]、铂纳米粒子 (PtNPs)^[53-54]、金属氧化物纳米粒子等, 在提高乳酸传感器性能方面发挥了重要作用。

3.2 酶的固定化策略

酶的固定化是酶基生物传感器构建的重要步骤之一。酶的固定化涉及电极表面和酶分子两个方面。酶分子是由通过形成肽键聚合在一起的氨基酸组成的, 通常, 一个或多个多肽链折叠成一个三维生物酶活性蛋白, 其上有许多官能团, 如羧基、胺、羟基和巯基。活性部位是蛋白质中靶分子或底物分子结合并经历化学反应的区域。为了发挥作用, 活性位点需要具有特定的构象, 才能与底物结合。酶分子在电极表面上的随机固定可能会导致活性位点变形失活或被屏蔽堵塞。因此, 在固定化过程中, 由于空间位阻和活性中心构象的改变, 酶分子的生物活性会部分或全部丧失^[55]。所以固定化酶载体材料和制备方法的选择是制备固定化酶的关键。

3.2.1 固定化酶的载体材料

酶的固定化载体必须是生物兼容的和廉价的, 以尽可能多的缩减制造成本。同时, 酶的载体必须能够承载大量的酶, 从而实现对L-乳酸的快速响应, 并且能够覆盖医学和农业L-乳酸检测的应用范围 (0.000 5~20 mmol/L)。高分子材料来源广泛, 成本低廉, 因此常用于制备固定化L-LOD和L-LDH的载体。高分子材料主要包括天然高分子材料和人工合成高分子材料^[56]。

常见的天然高分子材料有来自昆虫外壳的壳聚糖和甲壳素^[57-59]、木醋杆菌分泌的细菌纤维素^[60-61]、动物组织提取出的明胶^[62]及藻类植物中提取的海藻酸钠^[63]等。天然高分子材料作为酶固定化的载体具有易获得、节约成本等优点, 但是与酶的结合有些需要使用化学交联剂, 在一定程度上会破坏酶的稳定性和活性, 且载体不易回收, 可重复性利用差, 因此逐渐被人工合成的高分子材料所取代^[64]。

由天然高分子材料通过修饰或者化学手段人工合成的高分子材料作为固定化酶的载体往往具有更为优良的性能, 主要包括树脂类^[65-66]及磁性纳米载体^[67-70]。近些年磁性纳米材料作为酶的固定载体发展迅速, 如磁性纳米粒子^[71]。磁性纳米粒子

兼有磁性材料和纳米材料的优点, 可以通过改变外部磁场的方向、磁力大小来改变粒子的运动轨迹, 从而达到控制酶与载体结合与分离的目的, 便于固定化酶分离和回收^[72]。磁性纳米材料表面较平滑、单分散性好且结构疏松, 在生物医学、细胞学和生物工程及分离工程等方面发展迅速。

3.2.2 固定化酶的制备方法

目前主要的酶固定化方法有吸附固定、交联固定、包埋固定和定向结合^[73]。

吸附固定主要通过范德华力、氢键等物理作用力, 将酶分子固定在电极表面^[74]。这种方法操作简单, 由于固定化过程没有涉及化学修饰, 酶分子结构及活性中心没有受到破坏, 能够最大程度保留酶活。但酶分子只是单纯吸附到载体上, 与载体间作用力弱, 从而极易在载体上脱落^[75]。

交联固定通过双功能试剂与酶分子反应, 形成不溶性的三维交联体附着在电极表面, 从而实现酶的固定^[76]。常见的双功能试剂有戊二醛、双重氮联苯胺、乙二胺等, 其中最常用的是戊二醛^[77]。刘洋等^[78]采用戊二醛交联固定LOD的方法, 交联固定形成的生物组分不易脱落, 能够实现LOD分子的大量聚合, 使用寿命长。但是实验过程中需要严格控制交联剂的使用量, 反应比较难以控制, 且双功能试剂会降低LOD的活力, 较难获得活力高的固定化酶^[79]。

包埋固定是指将酶分子通过物理作用包埋在聚合物或者凝胶的微囊结构或网状结构中的一种方法, 常用的载体有明胶、琼脂、海藻酸钠等^[80]。王艳等^[81]利用海藻酸钙凝胶包埋LOD的方法, 催化DL-乳酸生产丙酮酸。这种方法与吸附法相似, 包埋过程不发生化学反应, LOD分子的高级结构没有被破坏, 可获得高酶活的固定化酶^[82]。

定向结合将多肽在基因水平上与蛋白质融合, 通过在蛋白质分子中设计可以暴露在分子表面的亲和基因序列, 实现可控的定点和定向固定化^[83]。合成和设计多肽将所需的化学基团插入到特定位置, 赋予新的亲和力特征和定向固定化。六组氨酸标签 (His-Tag)^[84]是最常用的亲和标签之一, 它具有在咪唑存在下可逆的优点, 可以将酶固定在表面, 同时保持高比活性、热稳定性, 并保证蛋白质的取向控制。

除以上4种传统酶固定化方法, 新型酶固定化方法纳米处理和磁处理的应用日益广泛。纳米处理是指将酶与纳米材料相结合制成纳米固定化酶, 纳

米材料的特殊性可以优化酶自身的理化性质, 提高酶的利用率和生产效率^[85]。磁处理^[86]是在固定过程中加入具有磁响应性的材料进行固定, 这样制备的固定化酶处于磁场环境中便可进行回收, 操作简单, 回收利用率高。有学者以戊二醛为交联剂制备了磁性壳聚糖微球固定 LOD 及 LDH^[87-88], 相比传统固定化方法, 新型固定化技术制作的固定化酶有着更强的催化活力, 固定化酶的性质更加稳定, 有着较好的应用前景。

3.3 酶分子工程改造策略

目前, 对 L-LOD 进行蛋白质工程改造主要涉及到两个方面, 一方面是通过定点突变或随机诱变获得在酶热稳定性或催化活性提高的酶分子。基于性能改良的酶分子构建乳酸生物传感器, 以提高传感器的稳定性、使用寿命以及灵敏度等性能, 增强其在 LOD 传感器上应用的实用性。例如, Minagawa 等^[89]通过随机突变产生的两个突变体 LOD15 (212 位点 Asn 突变为 Asp) 和 LODN1 (160 位点 Glu 突变为 Gly), 在 65°C 时比野生型 LOD 更耐热, 而且它们在 65°C 时的整体失活曲线不那么陡峭。其中 LODN1 与 LOD15 和野生型 LOD 相比, 传感器输出具有更好的线性度, 在相同的存储时间内, 其输出约为野生型 LOD 传感器的两倍。另外一方面是通过定点突变等方式改造酶分子, 以减少 LOD 以 O₂ 作为电子受体的氧化酶活性, 而保持甚至改善介体介导的脱氢酶活性, 以促进 LOD 与电极之间的电子传递。例如, Koji Sode 团队^[90]在 2020 年将来源于绿色球菌的 AvLOx Ala96Leu 进一步通过理性设计将 212 位的 Asn 突变为 Lys, 构建双突变体 AvLOx A96L/N212K, 并通过电子介质 1-[3-(琥珀酰亚基氧羰基)丙氧基]-5-乙基苯基三氟甲烷磺酸锌或胺反应性吩噻乙二磺酸盐 (arPES) 与双突变体的 Lys 残基的伯胺基团反应, 以最小的氧反应性实现酶与电极之间准直接电子转移 (DET)。该团队于 2021 年进一步通过融合酶技术将黄酮类色素 b2 (Fcb2) 血红素结构域与氧化酶活性最低但脱氢酶活性较高的 AvLOx A96L/N212K/A95S 三突变体融合, 实现酶与电极之间的直接电子传递, 对乳酸检测的线性范围达到 0.5~20 mmol/L, 灵敏度为 4.1 nA/(mmol·L⁻¹)·mm², 抗干扰能力等性能显著提高^[91]。

对于 L-LDH 应用于生物传感器方面的蛋白质工程改造主要为了克服辅酶 NAD⁺ 或 NADP 与酶分子结合不牢固, 通过固定化辅酶方法的创新, 实现

辅酶的可重复循环利用^[92], 降低基于 L-LDH 的传感器制造成本。

4 酶电极乳酸传感器的分类

近期的市场研究表明, 预计未来几年内, 多个领域对生物传感器的需求将大幅增长^[93]。L-乳酸生物传感器以其低成本、简单、现场检测、响应快、便携、样品前处理少或无样品前处理等特点被认为是最有实用价值的生物传感器^[94-95]。其中将酶固定于载体材料作为生物识别元件的固定化酶传感器研究最广泛且经济有效。载体的性质取决于生物传感方案, 根据所用的载体材料, 酶电极乳酸传感器主要分为以下几类。

4.1 基于膜的 L-乳酸生物传感器

基于膜的生物传感器为乳酸浓度的测定提供了一种快速、方便、灵敏的一次性方法。膜的存在可以直接将酶固定在电极上, 不仅增强了乳酸传感器的灵敏度与稳定性, 同时也减少在浸出过程中酶的脱落, 保持酶浓度的稳定性, 膜的存在使得乳酸传感器在 pH 变化较大范围内工作。但在对膜的要求较高, 并且容易遭受膜污染的问题, 或者毛孔半透膜容易被堵塞, 从而阻碍溶质通过。目前的膜主要有醋酸纤维素膜^[96]、聚二乙烯基苯膜、全氟磺酸 (Nafion) 膜^[97]、聚砜膜、聚吡咯膜^[98]、聚四氟乙烯膜等^[11] (图 6)。

4.2 溶胶-凝胶型 L-乳酸生物传感器

溶胶-凝胶型乳酸生物传感器主要利用多孔、透明的凝胶基质将酶包埋固定在电极上。这种凝胶方法固定具有稳定性强、孔隙率可调、酶在介质中不宜泄露的优点。但该类型的乳酸生物传感器由于基质不导电, 成为扩散限制步骤, 灵敏度较低, 并且酶与基质之间的相互作用及涉及的动力学尚不清楚。目前常用的溶胶-凝胶载体有硅溶胶^[99]、环氧石墨/石墨丝网印刷油墨^[100]、多壁碳纳米管/铂溶胶凝胶、碳化二亚胺耦合溶胶、甲基三甲氧基硅烷溶胶-凝胶等^[11] (图 6)。

4.3 基于纳米颗粒的 L-乳酸生物传感器

纳米颗粒在新型纳米生物传感器的制备中发挥着广泛的作用, 各种纳米材料, 如金纳米颗粒、碳纳米管、氧化锌 (ZnO) 纳米结构等被用于电极和酶中心的电子传递。纳米材料具有比表面积大、电子传递能力强、吸附性能好等优点, 被广泛应用于乳酸生物传感器中。常用的纳米载体有单壁/多壁碳纳米管^[101]、3-(巯丙基)三甲氧基硅烷 (MPTS)

衍生的金纳米颗粒^[102]以及半导体材料纳米颗粒, 如ZnO^[103](图6)。

4.4 基于高分子聚合物的L-乳酸生物传感器

高分子聚合物价格低廉, 生物相容性好, 而且在工作电极表面形成选择性涂层, 以减少或防止干扰化合物穿透电极表面上的传感层, 在生物传感器领域拥有广泛的应用前景^[104]。

4.4.1 基于导电聚合物基质的L-乳酸生物传感器

导电聚合物是一种有机共轭聚合物, 由于 π 或二价体系的存在而具有很强的导电性。导电聚合物大多通过单环前体氧化偶联反应脱氢合成, 可以用于酶包埋的电聚合。导电聚合物具有很好的导电能力, 在中性水环境中具有生物相容性, 提高了L-乳酸生物传感器灵敏度和选择性。常用的固定导电聚合物的支架有聚苯胺^[105]、聚乙烯亚胺(PEI)^[106]、聚吡咯等^[11]。

4.4.2 基于非导电聚合物基质的L-乳酸生物传感器

非导电高分子材料在用不同的氧化剂对其表面进行改性前后, 基本上都具有不同的官能团, 如胺类、羧酸类、硫醇类等。它们在实验室里很容易制备, 可以合成多种载体, 被广泛地用作电极表面的支撑膜来固定LDH/LOD, 这些非导电高分子材料为酶分子提供了良好的微环境, 提高了贮存稳定性。常用的固定非导电聚合物基质的支架有Nafion

聚合物、壳聚糖、聚乙烯醇(PVA)^[107]、聚乙烯亚胺(PEI)、钡等^[11](图6)。

4.5 基于丝网印刷电极的L-乳酸生物传感器

丝网印刷技术被广泛应用于生物传感器的制作中, 它由化学惰性衬底组成, 在衬底上使用丝网印刷技术印刷三个电极系统, 包括工作电极、参比电极和对电极^[108]。丝网印刷技术适用于微体积工作, 易于制备和修饰, 具有良好的特异性和选择性, 常用于固定酶的支持物有: 碳纳米管/聚吡咯丝网印刷电极、麦尔多拉蓝雷氏盐/醋酸纤维素膜(CA)丝网印刷电极^[109]、单壁碳纳米管/变胺蓝盐/碳丝网印刷电极、油墨电极、石墨环氧树脂/石墨丝网印刷油墨电极等^[11, 100](图6)。

4.6 基于水凝胶的L-乳酸生物传感器

水凝胶是一种由聚合链相互连接形成的三维聚合物网络, 分为天然水凝胶和合成水凝胶。聚合链具有亲水性, 并且以分散介质的形式存在于水中, 本质上具有高度吸附性。水凝胶可以为溶剂和底物分子提供足够的渗透性, 而且为酶提供生物相容的微环境, 表现出高度的敏感性, 但是此类载体由于机械强度低, 操作较困难。常用的固定化酶的水凝胶载体有聚乙烯基吡啶水凝胶、聚氨基甲酰基磺酸盐(PCS)水凝胶^[110]、硅酸镁锂水凝胶、硅酸镁锂-壳聚糖水凝胶等^[11](图6)。

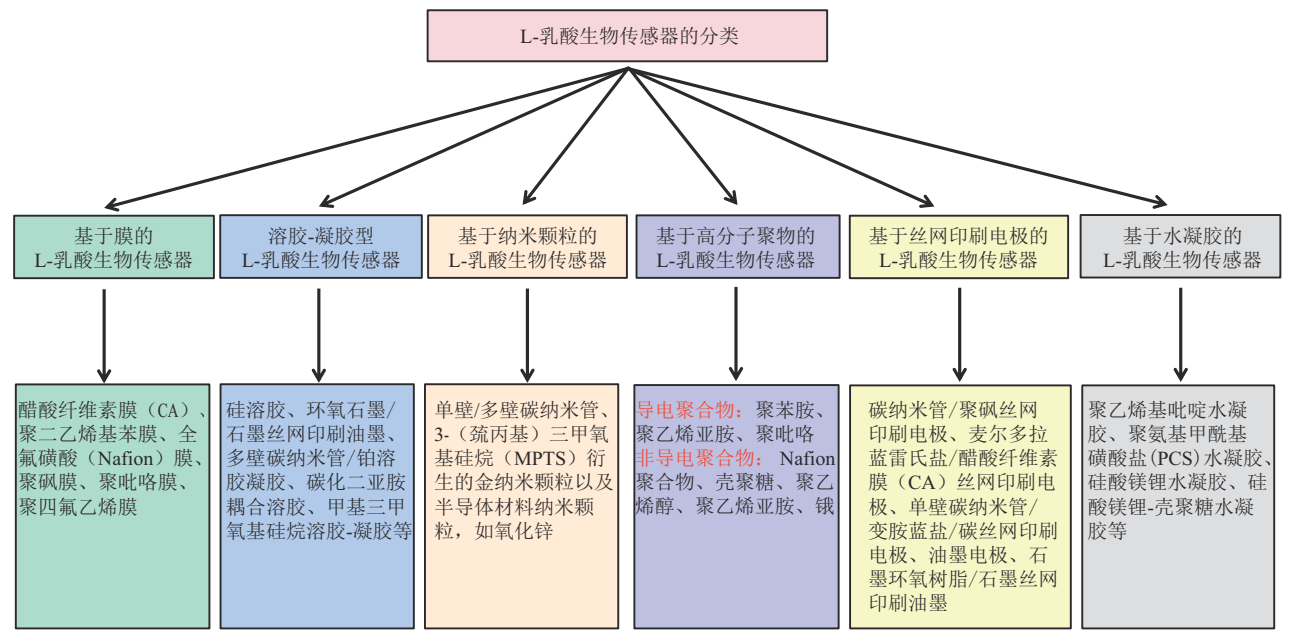


Fig. 6 Classification of L-lactic acid biosensors based on carrier materials^[30]
图6 基于载体材料的L-乳酸生物传感器分类^[30]

5 商业化酶电极乳酸传感器概况

目前已有多种生物传感器应用于临床或发酵工业领域(表1)。用于乳酸测定的商用生物传感器都是为测量全毛细血管中的血液设计的,分析时间短,使用方便^[111]。

大多数生物传感器(Biosen C-line、YSI 2300 STAT PLUS、CITSens Bio lactote PG13.5 C-cit AG、SBA-40E除外)在结构和应用上与血糖仪相似,在医院或家庭均可使用。用于医疗、体育和兽医用途的LactateScout+设备可以在市场上买到。在结构和工作原理上,它与血糖仪非常相似,由便携式分析仪和包含安培酶生物传感器的一次性试纸组成,这款设备主要为家庭使用而设计。StatStrip® Lactate系统主要应用于医院中血乳酸含量的测量,以诊断败血症的早期阶段。EDGE血乳酸监测系统可以分析全血样品,能够直接用试纸检测。然而,该系统只在有限的红细胞压积范围内(35%~50%)起作用,制造商建议主要用该系统测量运动员训练后乳酸水平的变化。其他生产商也有类似的设备如LactatePro 2 LT-1730、LactatePlus。

Biosen C-line可以同时测量乳酸和葡萄糖,其

最显著的优势通过对酶传感元件进行了较长时间的开发优化,可实现6 000次的乳酸检测及临床多样本的快速自动检测。YSI 2300 STAT PLUS是唯一一款双通道血糖血乳酸分析仪,它可以精确检测全血和血浆中的相关指标,包括血清中的葡萄糖、脑髓中的乳酸等,而且每次检测后无须更新酶膜,试剂和耗材的消耗极低。CITSens Bio lactote PG13.5 C-cit AG可以在特定的细胞培养基和复杂的基质(如血液)中对乳酸进行连续的原位测量,能够远程控制细胞培养过程,操作简单安全。本实验室自主研发SBA-40E是以固定化乳酸氧化酶为敏感元件,是中国最早实现产业化应用的乳酸生物传感器。它是由微电脑控制双指标智能化仪表,可以在20 s内定量分析样品中乳酸含量,具有测定速度快、精准度高、测定成本低、操作简单等特点。目前研究团队正采用生物信息学、合成生物学及分子生物学等生物技术,定向设计、改造和高效表达乳酸氧化酶、乳酸脱氢酶等传感元件,以期逐步实现优质传感器专用酶的国产化制造,并进一步提高乳酸传感器的稳定性、灵敏度、均质性性能,进一步提升国产生物传感器的市场竞争优势。

Table 1 Commercial lactic acid sensors for lactic acid determination

表1 用于乳酸测定的商用乳酸传感器

商用生物传感器名称	检测限/(mmol·L ⁻¹)	分析时间/s	样本类型及体积	储存稳定性	线性范围/(mmol·L ⁻¹)	生产国家	检测优势
LactatePro 2 LT-1730 	—	15	全血, 0.3 µl	18个月	0.5~25	日本京都	精确、可用于大规模测定
Biosen C-line 	0.5	20~45	发酵液、全血, 20 µl	50 d	0.5~40	德国EKF	精确、多样本自动检测, 可进行6 000次测量
LactateScout+ 	0.5	10	全血, 0.2 µl	—	0.5~25	德国EKF	单次和步进测试测量(静息/激活/重建)

续表1

商用生物传感器名称	检测限/ (mmol·L ⁻¹)	分析 时间/s	样本类型及 体积	储存稳 定性	线性范围/ (mmol·L ⁻¹)	生产 国家	检测优势
StatStrip® Lactate 	0.3	13	全血, 0.6 μl	24个月	—	美国Nova	很小的样本量可在短 时间给出稳定测定 结果
THE EDGE 	0.7	45	全血, 3 μl	—	0.7~22.2	中国 台湾	操作简便、测量准确
LaboTRACE compact trace analytics 	0.5	45	全血, 0.5 ml	—	0.5-30	德国	多达6个样品的分析系 统、测定快速准确
CITSens Bio lactote PG13.5 C-cit AG 	1	—	全血, 0.5 μl	—	1~60	瑞士	连续在线原位自动测 定, 无污染风险
YSI 2300 STAT PLUS 	0.1	≤45	发酵液、全血, 25 μl	14 d	0.1~15	美国	快速准确的分析结果、 操作简单安全、抗干 扰能力强
SBA-40E 	0.1	20	发酵液、全血, 25 μl	—	0.1~12	中国	测定速度快、结果准 确、操作简单、测定 范围较宽、测定样品 种类较多

6 乳酸生物传感器的未来应用方向

虽然酶电极乳酸生物传感器在多个领域具有广阔的应用前景(图1),但从第一个描述的乳酸检测酶电极,经过40多年的发展,其在不同于医学(包括运动医学)的实际应用领域仍然非常有限,尤其在食品和饮料生产中的应用主要局限于乳制品和葡萄酒的产品质量或生产过程控制。由于不同食品和饮料中的化学成分、pH值以及乳酸范围与血液完全不同,因此对乳酸生物传感器的性能需求存在差异。Przybyl等^[112]通过QUAL_JUICE项目将测定血液中L-乳酸的商业生物传感器用于果汁中L-乳酸的检测发现,只需要一些简单的样品制备(如用聚酰胺6代替聚乙烯吡咯烷酮吸收干扰物质对样品进行纯化)和一些操作规程的改变(校准频率),可以在不改变传感器结构的情况下用于果汁和其他产品的分析。这些结果为乳酸生物传感器在不同食品和饮料行业更广泛的应用提供了机会。此外,在生物制品工业发酵过程控制领域,L-乳酸含量的实时变化检测对微生物细胞功能、发酵底物、代谢物等关键参数的分析、诊断与精准控制具有重要作用,乳酸在线生物传感器具有巨大的市场潜力,但相对于L-乳酸离线测定的广泛应用,酶电极乳酸生物传感器的在线分析技术还不完善,需要在传感器酶传感元件制备、传感器稳定性提高、在线取样、数据分析等方面实现重大突破,以适应工业微生物发酵过程L-乳酸实时监控的要求。

在医学和运动医学领域,通过采集人体的血样或者活检等破坏性活检是目前乳酸检测的主要方式,这种方式在高频率检测时会给被检测者带来极大的痛苦并且无法实现被检测者L-乳酸的实时连续监测。随着柔性器件制造技术的发展,非植入性即时检测(point-of-care testing, POCT)传感方法和可穿戴设备的研究开发工作成为热点^[113]。

6.1 基于不同体液的可穿戴非植入式传感技术研究

近几年,许多学者针对可穿戴平台研究了具有轻量级和灵活性的非植入性POCT传感器^[114]。虽然多种取样部位可用于非植入性传感,但大多数研究集中于唾液、泪液、组织液、呼吸液和汗液等相关生物体液的非植入性传感机制来进行。

表皮汗液分析是一种非常具有前景的非植入性乳酸传感方法,如在柔性衬底上制造的非植入式纹身乳酸传感器^[115],该传感器的运行基于LOD,用于

连续和实时监测人体汗液中的乳酸水平。除此之外,在柔性生物传感器上带有离子凝胶固态电解质的有机电化学晶体管(OECT)传感器,可以用作可穿戴的绷带式传感器,在锻炼或健康监测期间佩戴,用于检测相关生理范围内的乳酸^[116]。Gao等^[117]将乳酸氧化酶固定在壳聚糖渗透膜上构建一种实时可穿戴汗液传感阵列,实现乳酸浓度实时监测(灵敏度 $220\text{ nA}/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$),该传感阵列机械性能好、稳定性强,具有较好应用潜力。

有些研究通过监测泪液中的乳酸盐水平来进行个人的保健和评估,如基于微创隐形眼镜的乳酸盐传感器,为收集乳酸变化生物信息提供了一个安全、无创的平台。另一种可穿戴式代谢物传感器用于检测唾液中的乳酸,该生物传感系统是利用聚邻苯二胺(PPD)/LOD设计的可印刷普鲁士蓝(PB)传感器,在柔性聚对苯二甲酸乙二酯基质上结合了可打印的酶电极^[118]。这种非植入性防护牙托传感器的目标是连续监测乳酸,从而实现乳酸高稳定性和高灵敏度的特异性检测。

6.2 可穿戴非植入式乳酸生物传感器面临的挑战及解决方向

目前,可穿戴非植入性乳酸传感器仍然存在许多挑战,弹性、长期稳定性、选择性、灵敏度、检测下限、能耗和生物兼容性等仍是当下亟待解决的问题。人体工学运动导致表皮传感器面临机械变形的挑战,当佩戴者处于强烈的身体压力下时,机械变形程度增加。尤其是基于纺织品的传感器,其中纺织品可能会受到巨大的机械、化学和热降解挑战^[119],可以利用柔性电子技术^[120]对传感器进行改造升级来解决这些挑战。基于纹身的可印刷电化学传感器也面临诸多问题,如校准、试剂泄露引起的污染以及机械应力条件下的稳定性和身体耐久性等^[121]。总体看来,这些可穿戴设备的延伸性有限,应结合新的低成本大规模制造技术加以改进。

酶传感器的稳定性^[122]和选择性是影响POCT监测可靠性的关键参数。在多分析物系统中,多个参数,如pH值、离子强度、不同的干扰分析物和操作条件(如温度、湿度、外加电压)都可以改变传感器的稳定性和选择性。为了克服稳定性问题,许多乳酸传感器在进入操作模式之前必须进行预处理或预校准,将稳定剂与选择性生物受体结合可以进一步提高传感器的稳定性^[123]。相关研究在存在电解质(如 Na^+ 、 K^+)的情况下,对乳酸和葡萄糖进行了选择性同时检测。为了提高选择性,多传感

器阵列可以通过互不相容的传感数据提供准确性和精确度来预测特定的乳酸浓度^[124]。此外, 通过加入纳米材料 (金属氧化物、SWCNTs/MWCNTs)、信号放大等手段, 可以使灵敏度和检测下限增强许多倍^[125]。

7 总结与展望

在各种乳酸检测方法中, 乳酸生物传感器具有灵敏度高、检出限低、制作简单、用户友好、便携、可靠、成本合理等优点, 是目前最主要的乳酸检测方法。近年来, 纳米材料和加工技术的迅猛发展极大促进了乳酸传感器中电子器件、光子器件的升级换代^[1], 这些新材料和技术也大大提高了传感器的性能, 同时也使通过非植入性传感方法, 如纹身和隐形眼镜等集成传感器, 检测废弃的体液 (汗水、眼泪等) 中乳酸含量成为可能。但是将乳酸生物传感器进一步小型化并广泛应用于可穿戴式健康、健康监测平台及集成乳酸水平检测器仍有很长一段路要走。未来在乳酸生物传感器检测 L-乳酸领域的工作应该包括: a. 进一步优化纳米结构以增强酶反应; b. 开发新型酶固定化方法并建立标准化固定化酶传感元件质量控制、评价体系; c. 通过提高传感器的抗干扰能力等特性, 将传感器应用于更复杂的介质, 如真实的生理流体或工业反应介质, 实现乳酸的实时、在线、原位检测; d. 目前的传感主要检测酶与电极之间的电子传递效率, 而酶结合催化乳酸脱氢过程可能还需要探索额外的传感方案, 通过两部分传感过程的综合评价确定酶传感性能的限速步骤, 从而指导优化酶传感元件制备策略^[26]。这些综合努力将会以前所未有的方式改变生物传感器行业、个人医疗保健以及生物制造领域的未来。

参 考 文 献

- [1] Fahmida A, Sohini R C, Hasnain J A, *et al.* Lactate biosensing: the emerging point-of-care and personal health monitoring. *Biosens Bioelectron*, 2018, **117**: 818-829
- [2] Kucherenko I S, Topolnikova Ya V, Soldatkin O O. Advances in the biosensors for lactate and pyruvate detection for medical applications: a review. *Trends Anal Chem*, 2019, **110**: 160-172
- [3] Kost G J. New whole blood analyzers and their impact on cardiac and critical care. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 1993, **30**(2): 153-202
- [4] Bakker J, Gris P, Coffernils M, *et al.* Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock. *Am J Surg*, 1996, **171**(2): 221-226
- [5] 魏亚茹, 刘妍妍, 周桐希, 等. 利用血乳酸评定短道速滑项目运动员无氧能力的研究. *沧州师范学院学报*, 2022, **38**(1): 94-98
- [6] Wei Y R, Liu Y Y, Zhou T X, *et al.* Journal of Cangzhou Normal University, 2022, **38**(1): 94-98
- [7] 臧宇, 申传安. 严重烧伤患者的乳酸和乳酸清除率: 指导复苏和预后的有效性和局限性. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2022, **38**(1): 68
- [8] Zang Y, Shen C A. *Chinese Journal of Burns*, 2022, **38**(1): 68
- [9] Khan M R R, Oh S, Choi G, *et al.* Highly sensitive, fast and wide dynamic range lactate sensor containing solvatochromic sensing membrane by combining the capacitance-to-phase conversion technique. *Sens Actuators B Chem*, 2020, **309**: 127783
- [10] Mazzei F, Azzoni A, Cavalieri B, *et al.* A multi-enzyme bioelectrode for the rapid determination of total lactate concentration in tomatoes, tomato juice and tomato paste. *Food Chem*, 1996, **55**(4): 413-418
- [11] 武彧, 杨德兴, 王虹, 等. 脓毒性休克患者早期动、静脉血乳酸相关性及乳酸、乳酸清除率的预后评估价值. *昆明医科大学学报*, 2021, **42**(9): 83-89
- [12] Wu Y, Yang D X, Wang H, *et al.* *Journal of Kunming Medical University*, 2021, **42**(9): 83-89
- [13] Nguyen H B, Rivers E P, Knoblich B P, *et al.* Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*, 2004, **32**(8): 1637-1642
- [14] Zhu L K, Li Y P, Carrera C A, *et al.* Calibration of a lactic-acid model for simulating biofilm-induced degradation of the dentin-composite interface. *Dent Mater*, 2017, **33**(11): 1315-1323
- [15] 曹立全, 陈加龙, 郭玉兰, 等. 乳酸阈强度训练对特警心肺机能的影响研究. *天津科技*, 2021, **48**(8): 78-81
- [16] Cao L Q, Chen J L, Guo Y L, *et al.* *Tianjin Science & Technology*, 2021, **48**(8): 78-81
- [17] Batra B, Narwal V, Pundir C S. An amperometric lactate biosensor based on lactate dehydrogenase immobilized onto graphene oxide nanoparticles-modified pencil graphite electrode. *Eng Life Sci*, 2016, **16**(8): 786-794
- [18] Iria B, Mónica R P, Félix P, *et al.* Reagent-Less and robust biosensor for direct determination of lactate in food samples. *Sensors*, 2017, **17**(12): 144
- [19] Monošík R, Středánský M, Greif G, *et al.* A rapid method for determination of L-lactic acid in real samples by amperometric biosensor utilizing nanocomposite. *Food Control*, 2012, **23**(1): 238-244
- [20] Dai G Y, Hu J L, Zhao X Y, *et al.* A colorimetric paper sensor for lactate assay using a cellulose-binding recombinant enzyme. *Sens Actuators B Chem*, 2017, **238**: 138-144
- [21] Kuşbaşı A, Göcek İ, Baysal G, *et al.* Lactate detection by colorimetric measurement in real human sweat by microfluidic-based biosensor on flexible substrate. *J Text Inst*, 2019, **110**(86): 1725-1732
- [22] Promphet N, Rattanawaleediroj P, Siralertmukul K, *et al.* Non-invasive textile based colorimetric sensor for the simultaneous detection of sweat pH and lactate. *Talanta*, 2019, **192**: 424-430
- [23] Bollella P, Sharma S, Antiochia R, *et al.* Microneedle-based

- biosensor for minimally-invasive lactate detection. *Biosens Bioelectron*, 2019, **123**: 152-159
- [20] Shoji A, Takahashi Y, Osato S, *et al.* An enzyme-modified capillary as a platform for simultaneous fluorometric detection of D-glucose and L-lactate. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, **163**: 1-8
- [21] 赵璇, 赵汉鹰, 李素琴. 清香型酒醅中乳酸和乙酸的测定研究. *酿酒*, 2021, **48**(5): 91-93
- Zhao X, Zhao H Y, Li S Q. *Liquor Making*, 2021, **48**(5): 91-93
- [22] 陈乔, 罗珠, 廖勤俭, 等. 白酒中乳酸的检测与分析方法. *酿酒科技*, 2021, **325**(7): 115-118
- Chen Q, Luo Z, Liao Q J, *et al.* *Liquor-Making Science & Technology*, 2021, **325**(7): 115-118
- [23] Sriboonvorakul N, Leepipatpiboon N, Dondorp A M, *et al.* Liquid chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous determination of small organic acids potentially contributing to acidosis in severe malaria. *J Chromatogr B*, 2013, **941**(100): 116-122
- [24] North S H, Lock E H, Taitt C R, *et al.* Critical aspects of biointerface design and their impact on biosensor development. *Anal Bioanal Chem*, 2010, **397**(3): 925-933
- [25] Nikolaus N, Strehlitz B. Amperometric lactate biosensors and their application in (sports) medicine, for life quality and wellbeing. *Microchim Acta*, 2008, **160**: 15-55
- [26] Rattu G, Khansili N, Maurya V K, *et al.* Lactate detection sensors for food, clinical and biological applications: a review. *Environ Chem Lett*, 2020, **19**: 1135-1152
- [27] 饶钧玥, 吴任之, 曹芸榕, 等. 基于酶的电化学传感器在食品检测中应用的研究进展. *食品与发酵工业*, 2022, **48**(18): 337-344
- Rao J Y, Wu R Z, Cao Y R, *et al.* *Food and Fermentation Industries*, 2022, **48**(18): 337-344
- [28] Nguyen H H, Lee S H, Lee U J, *et al.* Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. *Materials*, 2019, **12**(1): 121-128
- [29] 曹强, 肖雨诗, 孟庆一, 等. 酶基生物传感器在快速检测中的研究进展. *食品安全质量检测学报*, 2019, **10**(20): 6902-6908
- Cao Q, Xiao Y S, Meng Q Y, *et al.* *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2019, **10**(20): 6902-6908
- [30] Pundir C S, Narwal V, Batra B. Determination of lactic acid with special emphasis on biosensing methods: a review. *Biosens Bioelectron*, 2016, **86**: 777-790
- [31] Lin D, Du D, Zhang X J, *et al.* Trends in cell-based electrochemical biosensors. *Curr Med Chem*, 2008, **15**: 3160-3170
- [32] Romero M R, Ahumada F, Garay F, *et al.* Amperometric biosensor for direct blood lactate detection. *Anal Chem*, 2010, **82**(13): 5568-5572
- [33] Chaubey A, Malhotra B D. Mediated biosensors. *Biosens Bioelectron*, 2002, **17**(6): 441-456
- [34] Jalal A H, Umasankar Y, Gonzalez P J, *et al.* Multimodal technique to eliminate humidity interference for specific detection of ethanol. *Biosens Bioelectron*, 2017, **87**: 522-530
- [35] Zhang C, Zhang R, Gao X, *et al.* Small naked Pt nanoparticles confined in mesoporous shell of hollow carbon spheres for high-performance nonenzymatic sensing of H₂O₂ and glucose. *ACS Omega*, 2018, **3**(1): 96-105
- [36] 谷劲松, 许平, 李铁林, 等. 乳酸氧化酶转化乳酸产丙酮酸. *应用与环境生物学报*, 2001, **7**(6): 102-105
- Gu J S, Xu P, Li T L, *et al.* *Journal of Applied and Environmental Biology*, 2001, **7**(6): 102-105
- [37] 谷劲松, 曲音波. 丙酮酸的酶法转化及乳酸氧化酶的研究进展. *微生物学通报*, 2003, **30**(7): 86-90
- Gu J S, Qu Y B. *Bulletin of Microbiology*, 2003, **30**(7): 86-90
- [38] Karube I, Matsunaga T, Teraoka N, *et al.* Microbioassay of phenylalanine in blood sera with a lactate electrode. *Anal Chim Acta*, 1980, **119**(2): 271-276
- [39] Matsunaga T, Karube I, Teraoka N, *et al.* Determination of cell numbers of lactic acid producing bacteria by lactate sensor. *Appl Microbiol Biotechnol* 1982, **16**(2): 157-160
- [40] Clark L C, Noyes L K, Grooms T A, *et al.* Rapid micromasurement of lactate in whole blood. *Crit Care Med*, 1984, **12**(5): 461-464
- [41] 周文丽, 缪明永. 乳酸脱氢酶与肿瘤免疫代谢研究进展. *肿瘤代谢与营养电子杂志*, 2020, **7**(4): 396-401
- Zhou W L, Miu M Y. *Electronic Journal of Metabolism and Nutrition of Cancer*, 2020, **7**(4): 396-401
- [42] Laidler K J, Bunting P S. The chemical kinetics of enzyme action. *J Am Chem Soc*, 1959, **81**(6): 1521-1522
- [43] 侯若冰, 陈志达, 卞江, 等. L-乳酸脱氢酶催化反应机理的理论研究进展. *化学通报*, 2000, **63**(1): 15-21
- Hou R B, Chen Z D, Bian J, *et al.* *Chem Bull*, 2000, **63**(1): 15-21
- [44] Bernard N, Ferain T, Garmyn D, *et al.* Cloning of the D-lactate dehydrogenase gene from *Lactobacillus delbrueckii* sub sp. *bulgaricus* by complementation in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 1991, **290**(1-2): 61-64
- [45] Gué A M, Tap H, Gros P, *et al.* A miniaturised silicon based enzymatic biosensor: towards a generic structure and technology for multi-analytes assays. *Sens Actuators B Chem*, 2002, **82**(2-3): 227-232
- [46] Rahman M M, Shiddiky M, Rahman M A, *et al.* A lactate biosensor based on lactate dehydrogenase/nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form) immobilized on a conducting polymer/multiwall carbon nanotube composite film. *Anal Biochem*, 2009, **384**(1): 159-165
- [47] Pereira A C, Aguiar M R, Kisner A, *et al.* Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and Meldola Blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube. *Sens Actuators B Chem*, 2007, **124**(1): 269-276
- [48] Thévenot D R, Toth K, Durst R A, *et al.* Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron*, 2001, **34**(5): 635-659
- [49] Blaedel W J, Engstrom R C. Reagentless enzyme electrodes for ethanol, lactate, and malate. *Anal Chem*, 2002, **52**(11): 1691-1697
- [50] Mamkhezri S. Electrocatalytic reduction of H₂O₂ on the surface of thionin incorporated onto MWCNTs modified glassy carbon electrode: application to glucose detection. *Electroanalysis*, 2007,

- 19: 1100-1108
- [51] Goran J M, Lyon J L, Stevenson K J. Amperometric detection of L-lactate using nitrogen-doped carbon nanotubes modified with lactate oxidase. *Anal Chem*, 2011, **83**(21): 8123-8129
- [52] Gamero M, Pariente F, Lorenzo E, *et al.* Nanostructured rough gold electrodes for the development of lactate oxidase-based biosensors. *Biosens Bioelectron*, 2010, **25**(9): 2038-2044
- [53] Yu Y Y, Yang Y, Gu H, *et al.* Size-tunable Pt nanoparticles assembled on functionalized ordered mesoporous carbon for the simultaneous and on-line detection of glucose and L-lactate in brain microdialysate. *Biosens Bioelectron*, 2013, **41**(1): 511-518
- [54] He X R, Yu J H, Ge S G, *et al.* Amperometric L-lactate biosensor based on sol-gel film and multi-walled carbon nanotubes/platinum nanoparticles enhancement. *Chin J Anal Chem*, 2010, **38**(1): 57-61
- [55] Liu Y, Yu J. Oriented immobilization of proteins on solid supports for use in biosensors and biochips: a review. *Microchim Acta*, 2016, **183**(1): 1-19
- [56] 吴兆明, 杨敏, 孙颖, 等. 酶固定化载体材料的研究进展. *食品安全质量检测学报*, 2018, **9**(5): 1031-1037
- Wu Z M, Yang M, Sun Y, *et al.* *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2018, **9**(5): 1031-1037
- [57] Krajewska B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme Microb Technol*, 2004, **35**(2-3): 126-139
- [58] 唐震航, 陈卓. 壳聚糖促进牙釉质仿生矿化修复的研究进展. *口腔医学*, 2022, **42**(3): 256-260
- Tang Z H, Chen Z. *Stomatology*, 2022, **42**(3): 256-260
- [59] Popelka A, Novák I, Lehocký M, *et al.* A new route for chitosan immobilization onto polyethylene surface. *Carbohydr Polym*, 2012, **90**(4): 1501-1508
- [60] 耿俊强, 刘辰澍, 郝艺琳, 等. 木醋杆菌产细菌纤维素的条件优化及其对文物纸张加固的应用研究. *中华纸业*, 2022, **43**(4): 13-18
- Geng J Q, Liu C S, Hao Y L, *et al.* *China Pulp Paper Industry*, 2022, **43**(4): 13-18
- [61] Wu S C, Lia Y K. Application of bacterial cellulose pellets in enzyme immobilization. *J Mol Catal B Enzym*, 2008, **54**(3-4): 103-108
- [62] Vujčić Z, Margetic A, Bozic N, *et al.* Immobilization of cell wall invertase modified with glutaraldehyde for continuous production of invert sugar. *J Agric Food Chem*, 2010, **58**(22): 11896-11900
- [63] 郝红英, 于正花, 詹海鹏, 等. 海藻酸钠与 MOFs 复合材料固定化果胶酶的研究. *安徽农业科学*, 2020, **48**(23): 6-9
- Hao H Y, Yu Z H, Zhan H J, *et al.* *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2020, **48**(23): 6-9
- [64] 董炎炎, 刘长虹, 马霞. 酶固定化载体材料的研究进展. *上海应用技术学院学报: 自然科学版*, 2013, **13**(4): 295-298
- Dong Y Y, Liu C H, Ma X. *Journal of Technology*, 2013, **13**(4): 295-298
- [65] 徐珊, 李任强, 张继福, 等. 使用国产环氧树脂 LXEP-120 固定化脂肪酶研究. *广西师范大学学报(自然科学版)*, 2018, **36**(4): 108-118
- Xu S, Li R Q, Zhang J F, *et al.* *Journal of Guangxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2018, **36**(4): 108-118
- [66] 韦威. 基于大孔吸附树脂为载体固定化脂肪酶的制备及表征[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2019
- Wei W. *Preparation and Characterization of Immobilized Lipase Based on Macroporous Adsorbent Resin*[D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2019
- [67] 张玮玮, 杨慧霞. 基于磁性纳米载体的固定化脂肪酶在生物柴油中的应用研究进展. *石油化工应用*, 2017, **36**(12): 1-4
- Zhang W W, Yang H X. *Petrochemical Industry Application*, 2017, **36**(12): 1-4
- [68] Wang H, Huang J, Wang C, *et al.* Immobilization of glucose oxidase using $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{SiO}_2$ nanoparticles as carrier. *Appl Surf Sci*, 2011, **257**(13): 5739-5745
- [69] 程娟. $\text{CuTAPP-Fe}_3\text{O}_4$ 纳米复合粒子固定化 GOD 及其应用[D]. 武汉: 武汉理工大学, 2008
- Cheng J. *Immobilization of God on Cutapp- Fe_3O_4 Nanocomposite Particles and Its Application*[D]. Wuhan: Wuhan University of Technology, 2008
- [70] Singh V, Singh D. Polyvinyl alcohol-silica nanohybrids: an efficient carrier matrix for amylase immobilization. *Process Biochem*, 2013, **48**(1): 96-102
- [71] 张玮玮, 杨慧霞, 薛屏. 功能化磁性纳米粒子在固定化酶研究中的应用. *中国生物化学与分子生物学报*, 2020, **36**(4): 392-400
- Zhang W W, Yang H X, Xue P. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, **36**(4): 392-400
- [72] 王艳娥. 磁性纳米粒子对脂肪酶 CRL 的固定化[D]. 南宁: 广西大学, 2019
- Yang Y E. *Magnetic Nanoparticles Immobilized of Lipase CRL* [D]. Nanning: Guangxi University, 2019
- [73] 王冕, 李威. 酶电极中酶固定化方法的研究进展. *现代商贸工业*, 2017, **38**(20): 196-198
- Wang M, Li W. *Modern Business Trade Industry*, 2017, **38**(20): 196-198
- [74] You J K, Yu X Y, Zhao P. Progress and trend of adsorption-based enzyme immobilization. *Chem Eng (CHN)*, 2012, **40**(4): 1-5
- [75] 王芳芳, 郑艺华, 徐斐, 等. 阳离子交换树脂吸附交联固定鸡肝酯酶的实验研究. *离子交换与吸附*, 2005, **21**(1): 9-16
- Wang F F, Zheng Y H, Xu F, *et al.* *Ion Exchange and Adsorption*, 2005, **21**(1): 9-16
- [76] 林海蛟, 王云鹏, 张云, 等. 无机载体吸附-交联固定化海洋脂肪酶技术研究. *江西农业大学学报*, 2019, **41**(1): 186-196
- Lin H J, Wang Y P, Zhang Y, *et al.* *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2019, **41**(1): 186-196
- [77] 邓冬梅, 潘淑兰, 劳振华, 等. 脂肪酶 Lip2 在蚕丝表面交联固定及其催化性质. *广西科技大学学报*, 2018, **29**(2): 84-90
- Deng D M, Pan S L, Lao Z H, *et al.* *Journal of Guangxi University of Science and Technology*, 2018, **29**(2): 84-90
- [78] 刘洋, 周晶辉, 赵强, 等. 乳酸氧化酶的固定化研究. *化学与生物工程*, 2020, **37**(12): 40-44
- Liu Y, Zhou J H, Zhao Q, *et al.* *Chemistry and Bioengineering*,

- 2020, **37**(12): 40-44
- [79] Chesne S, Villiers C L, Arlaud G J, *et al.* An improvement glutaraldehyde crosslinking method for enzyme immobilization on chitosan. *Chin J Biotechnol*, 1996, **64**(6): 697-706
- [80] Han Z P, Ye J Z, Luo R Q. Progress of immobilized enzymes in preparation and application in food processing field. *Storage and Process*, 2012, **12**(5): 48-53
- [81] 王艳, 姚莉丽, 周林, 等. 海藻酸钙凝胶包埋乳酸氧化酶催化 DL-乳酸生产丙酮酸. *应用化学*, 2008, **25**(4): 489-493
Wang Y, Yao L L, Zhou L, *et al.* *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2008, **25**(4): 489-493
- [82] 郎伟超, 张丽. 共价结合法固定化酶活性载体的研究进展. *生物技术世界*, 2013, **10**: 1-7
Lang W C, Zhang L. *Biotech World*, 2013, **10**: 1-7
- [83] Faccio G. From protein features to sensing surfaces. *Sensors*, 2018, **18**(4): 1204
- [84] Hochuli E, Bannwarth W, Döbeli H, *et al.* Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. *Nat Biotechnol*, 1988, **6**(11): 1321-1325
- [85] 姚稼灏, 薛雅鞠, 赵永亮, 等. 多孔纳米材料固定化酶研究进展. *微生物学通报*, 2020, **47**(7): 2177-2192
Yao J H, Xue Y J, Zhao Y L, *et al.* *Microbiology China*, 2020, **47**(7): 2177-2192
- [86] 蔡晓敏. 新型磁柔性载体的制备及固定化脂肪酶的应用研究 [D]. 杭州: 浙江工商大学, 2018
Cai X M. Preparation of Novel Magnetic Flexible Carriers and Its Application in Immobilization of Lipase [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2018
- [87] 刘真, 常雁红, 刘仁霖, 等. 磁性壳聚糖微球的制备及对乳酸氧化酶的固定化研究. *现代化工*, 2007, **S2**: 310-313
Liu Zhen, Chang Y H, Liu R L, *et al.* *Modern Chemical Industry*, 2007, **S2**: 310-313
- [88] 覃建军, 刘璇, 柳畅先. 壳聚糖固定化乳酸脱氢酶的制备及酶学性质研究. *分析科学学报*, 2009, **25**(5): 571-574
Qin J J, Liu X, Liu C X. *Journal of Analytical Science*, 2009, **25**(5): 571-574
- [89] Minagawa H, Nakayama N, Matsumoto T, *et al.* Development of long life lactate sensor using thermostable mutant lactate oxidase. *Biosens Bioelectron*, 1998, **13**(3-4): 313-318
- [90] Hiraka K, Kojima K, Tsugawa W, *et al.* Rational engineering of *Aerococcus viridans* L-lactate oxidase for the mediator modification to achieve quasi-direct electron transfer type lactate sensor. *Biosens Bioelectron*, 2020, **151**: 111974-111982
- [91] Hiraka K, Tsugawa W, Asano R, *et al.* Rational design of direct electron transfer type L-lactate dehydrogenase for the development of multiplexed biosensor. *Biosens Bioelectron*, 2021, **176**(1): 112933-112942
- [92] Zheng H, Zhang S, Liu X, *et al.* Synthesis of a PEDOT-TiO₂ heterostructure as a dual biosensing platform operating via photoelectrochemical and electrochemical transduction mode. *Biosens Bioelectron*, 2020, **162**: 112234-112243
- [93] Rattu G, Khansili N, Maurya V K, *et al.* Lactate detection sensors for food, clinical and biological applications: a review. *Environ Chem Lett*, 2020, **19**: 1135-1152
- [94] Serra B, Reviejo A J, Parrado C, *et al.* Graphite-Teflon composite bienzyme electrodes for the determination of L-lactate: application to food samples. *Biosens Bioelectron*, 1999, **14**(5): 505-513
- [95] Rassaei L, Olthuis W, Tsujimura S, *et al.* Lactate biosensors: current status and outlook. *Anal Bioanal Chem*, 2016, **406**(1): 123-137
- [96] Sprules S D, Hart J P, Wring S A, *et al.* A reagentless, disposable biosensor for lactic acid based on a screen-printed carbon electrode containing Meldola's Blue and coated with lactate dehydrogenase, NAD⁺ and cellulose acetate. *Anal Chim Acta*, 1995, **304**(1): 17-24
- [97] Haghighi B, Bozorgzadeh S. Fabrication of a highly sensitive electrochemiluminescence lactate biosensor using ZnO nanoparticles decorated multiwalled carbon nanotubes. *Talanta*, 2011, **8540**: 2189-2193
- [98] 朱立平, 陆云. 聚吡咯膜电化学包埋固定酶及其复合酶生物传感器. *功能材料*, 2005, **4**: 619-621
Zhu L P, Lu Y. *Journal of Functional Materials*, 2005, **4**: 619-621
- [99] Pereira A C, Kisner A, Tarley C R T, *et al.* Development of a carbon paste electrode for lactate detection based on Meldola's Blue adsorbed on silica gel modified with niobium oxide and lactate oxidase. *Electroanalysis*, 2011, **23**(6): 1470-1477
- [100] Prieto-Simón B, Fàbregas E, Hart A. Evaluation of different strategies for the development of amperometric biosensors for L-lactate. *Biosens Bioelectron*, 2007, **22**(11): 2663-2668
- [101] Pereira A C, Aguiar M R, Kisner A, *et al.* Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and Meldola Blue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube. *Sens Actuators B Chem*, 2007, **124**(1): 269-276
- [102] Jena B K, Raj C R. Amperometric L-lactate biosensor based on gold nanoparticles. *Electroanalysis*, 2007, **19**(7-8): 816-822
- [103] Wang Y T, Yu L, Wang J, *et al.* A novel L-lactate sensor based on enzyme electrode modified with ZnO nanoparticles and multiwall carbon nanotubes. *J Electroanal Chem*, 2011, **661**(1): 8-12
- [104] Cosnier S. Biosensors based on electropolymerized films: new trends. *Anal Bioanal Chem*, 2010, **17**(3): 1701-1715
- [105] Halliwell C M, Simon E, Toh C S, *et al.* Immobilisation of lactate dehydrogenase on poly(aniline)-poly(acrylate) and poly(aniline)-poly(vinyl sulphonate) films for use in a lactate biosensor. *Anal Chim Acta*, 2002, **453**(2): 191-200
- [106] Shu H C, Mattiasson B, Persson B, *et al.* A reagentless amperometric electrode based on carbon paste, chemically modified with D-lactate dehydrogenase, NAD⁺, and mediator containing polymer for D-lactic acid analysis. I. Construction, composition, and characterization. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **46**(3): 270-279
- [107] Hajizadeh K, Halsall H B, Heineman W R. Immobilization of lactate oxidase in a poly(vinyl alcohol) matrix on platinized graphite electrodes by chemical cross-linking with isocyanate.

- Talanta, 1991, **38**(1): 37-47
- [108] Li M, Li Y T, Li D W, *et al.* Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays-a review. *Anal Chim Acta*, 2012, **734**: 31-44
- [109] Piano M, Serban S, Pittson R, *et al.* Amperometric lactate biosensor for flow injection analysis based on a screen-printed carbon electrode containing Meldola's Blue-Reinecke salt, coated with lactate dehydrogenase and NAD⁺. *Talanta*, 2010, **82**(1): 34-37
- [110] Kwan R C H, Hon P Y T, Mak K K W, *et al.* Amperometric determination of lactate with novel trienzyme/poly(carbamoyl) sulfonate hydrogel-based sensor. *Biosens Bioelectron*, 2004, **19**(12): 1745-1752
- [111] Zanini V P, Mishima B L, Labbé P, *et al.* An L-lactate amperometric enzyme electrode based on L-lactate oxidase immobilized in a laponite gel on a glassy carbon electrode: application to dairy products and red wine. *Electroanalysis*, 2010, **22**(9): 946-954
- [112] Przybyt M. Lactate biosensors for food industry. *Biotechnol Food Sci*, 2014, **78**(1): 71-88
- [113] 苏炳添, 李健良, 徐慧华, 等. 科学训练辅助: 柔性可穿戴传感器运动监测应用. *中国科学: 信息科学*, 2022, **52**(1): 54-74
Su B T, Li J L, Xu H H, *et al.* *Sci Sin Inform*, 2022, **52**(1): 54-74
- [114] Labroo P, Cui Y. Electrical, enzymatic graphene biosensing of 5-aminosalicylic acid. *Analyst*, 2013, **138**(5): 1325-1328
- [115] Kim J, Campbell A S, Wang J, *et al.* Wearable biosensors for healthcare monitoring. *Nat Biotech*, 2019, **37**(4): 389-406
- [116] Liu Y, Pharr M, Salvatore G A. Lab-on-skin: a review of flexible and stretchable electronics for wearable health monitoring. *ACS Nano*, 2017, **11**(10): 9614-9635
- [117] Gao W, Emaminejad S, Nyein H Y Y, *et al.* Fully integrated wearable sensor arrays for multiplexed *in situ* perspiration analysis. *Nature*, 2016, **529**(7587): 509-514
- [118] Yang Y, Gao W. Wearable and flexible electronics for continuous molecular monitoring. *Chem Soc Rev*, 2019, **48**(6): 1465-1491
- [119] Bandodkar A J, Wang J. Non-invasive wearable electrochemical sensors: a review. *Trends Biotechnol*, 2014, **32**(7): 363-371
- [120] Gao W, Ota H, Kiriya D, *et al.* Flexible electronics toward wearable sensing. *ACC Chem Res*, 2019, **52**(3): 523-533
- [121] Wang Q, Ling S, Liang X, *et al.* Self-healable multifunctional electronic tattoos based on silk and graphene. *Adv Funct Mater*, 2019, **29**(16): 1808695
- [122] Heikenfeld J, Jajack A, Rogers J, *et al.* Wearable sensors: modalities, challenges, and prospects. *Lab Chip*, 2018, **18**(2): 217-248
- [123] Jolly P, Tamboli V, Harniman R L, *et al.* Aptamer-MIP hybrid receptor for highly sensitive electrochemical detection of prostate specific antigen. *Biosens Bioelectron*, 2016, **75**: 188-195
- [124] Bandodkar A J, Jeerapan I, Wang J. Wearable chemical sensors: present challenges and future prospects. *ACS Sens*, 2016, **1**(5): 464-482
- [125] Taghdisi S M, Danesh N M, Emrani A S, *et al.* A novel electrochemical aptasensor based on single-walled carbon nanotubes, gold electrode and complimentary strand of aptamer for ultrasensitive detection of cocaine. *Biosens Bioelectron*, 2015, **73**: 245-250

Lactic Acid Biosensor Based on Enzyme Electrode*

CHEN Yan-Ru^{1,2)}, GONG Wei-Li^{1,2)**}, MA Yao-Hong^{1,2)}, WANG Bing-Lian^{1,2)}, ZHANG Zhen-Yu^{1,2)},
MENG Qing-Jun^{1,2)}, YANG Yan^{1,2)}, YANG Jun-Hui^{1,2)}, LIU Qing-Ai^{1,2)}, ZHENG Lan^{1,2)}

⁽¹⁾Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China;

⁽²⁾Shandong Provincial Key Laboratory of Biosensors, Jinan 250103, China)

Abstract Lactic acid ($C_3H_6O_3$), also known as 2-hydroxypropionic acid, propanoic acid, is a type of hydroxy acid. It is an essential metabolite of human and microbial cells. In diagnosis and medical management, determination of lactate level in serum is greatly required, and it is also important to measure lactate in fermentative foods to access their quality. Therefore, how to detect lactic acid in different samples with high throughput has become the focus of different researches. The traditional lactic acid detection methods are complicated, time-consuming and laborious, or requires expensive detection equipments. However, the electrochemical enzymatic L-lactate biosensors combining the robustness of electrochemical techniques with the specificity of biological recognition processes showed great advantages over the conventional analytical techniques in size, cost, sensitivity, selectivity, response speed and sample pre-treatment, which show a broad application prospects. There are two main types of lactate biosensors based on L-lactate oxidase (L-LOD) and L-lactate dehydrogenase (L-LDH). Designing a successful enzyme-based L-lactate biosensor requires assembling the enzyme onto a solid carrier and selecting an appropriate transduction strategy between the enzyme and the electrode. Due to the restriction of enzyme molecular structures, reaction mechanism and electrode materials, the traditional lactate biosensors have some limitations in sensitivity, selectivity and stability. Therefore, an increased research was performed to improve the performance of lactate sensors according to the characteristic of the enzymes and the electron transfer type. In this paper, we provide an overview of the structural characteristics, origin and catalytic mechanism of L-LOD and L-LDH, and discuss three strategies, including electrode material modification, enzyme immobilization and enzyme engineering modification, to improve the performance of enzyme electrode based lactate biosensors. In addition, the lactate biosensors were compared and analyzed on the basis of different carriers including membrane, transparent gel matrix, hydrogel carrier, nano-particles, etc. Finally, we comprehensively described the merits and demerits of current commercial lactate sensors and preconceive how emerging new technologies may benefit to future lactate biosensor design.

Key words lactate detection, lactate biosensor, L-lactate oxidase, L-lactate dehydrogenase

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0220

* This work was supported by grants from National Key R&D Program of China (2021YFB3201200, 2021YFB3201203), The National Natural Science Foundation of China (32101222), and Science, Education and Industry integration Pilot Training Project of Qilu University of Technology (2022PY067).

** Corresponding author.

Tel: 86-15264110812, E-mail: 15264110812@163.com

Received: May 12, 2022 Accepted: July 4, 2022